

**Molekulare Grundlagen der episomalen Replikation:
Charakterisierung zirkulärer,
nichtviraier Vektoren**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Kristina Nehlsen
aus Hildesheim

1. Referent:	Prof. Dr. Jürgen Bode
2. Referent:	Prof. Dr. Ralf-Rainer Mendel
eingereicht am:	15.01.2004
mündliche Prüfung (Disputation) am:	23.04.2004
Druckjahr:	2004

Vorveröffentlichungen und Tagungsbeiträge

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Betreuer der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Bode, J., Fetzner, C., Nehlsen, K., Scinteie, M., Hinrich, B.H., Baiker, A., Piechaczek, C., Benham, C. and Lipps, H.J. (2001). The hitchhiking principle. Optimizing episomal vectors for the use in gene therapy and biotechnology. *Int. J. Gene Ther. Mol. Biol.* **6**: 33-46.

Lipps, H.J., Jenke, A.C.W., Nehlsen, K., Scinteie, M.F., Stehle, I.M. and Bode, J. (2003). Chromosome-based vectors for gene therapy. *Gene* **304**: 23-33.

Tagungsbeiträge:

Bode, J., Baer, A., Ernst, E., Knopp, A., Nehlsen, K., Benham, C., Lipps, H.-J., and Baiker, A. (2000). Definition of autonomously regulated chromatin domains and utilization of their active elements. BITS-Meeting 2000.

Bode, J., Baer, A., Ernst, E., Knopp, A., Nehlsen, K., Benham, C., Lipps, H. J. and Baiker, A. (2000). Functional bordering elements in the human interferon gene cluster on 9p22 and their use for the improvement of transgenes. German Human Genome Meeting 30.11.-1.12.2000, DKFZ, Heidelberg: From Functional Genomics to Target Validation.

Bode, J., Baer, A., Ernst, E., Goetze, S., Knopp, A., Nehlsen, K., Benham, C. Lipps, H. J. and Baiker, A. (2001). Definition of autonomously regulated chromatin domains and utilization of their active elements. European Science Foundation Workshop Schloss Elmau 27.-30. September 2001: Understanding chromosome behavior: prospects for constructing chromosome-based vectors for gene therapy.

Bode, J., Goetze, S., Huesemann, Y., Nehlsen, K. (2002). Nuclear Function and Vector Design; 2nd Elmau Conference on Nuclear Organisation.

Inhalt

Zusammenfassung.....	VI
1. Einleitung	1
1.1. Die Organisation des Chromatins im Zellkern	1
1.1.1. Scaffold/Matrix Attachment Regions (S/MARs)	4
1.2. Die DNA-Replikation.....	6
1.3. Virale Vektorsysteme	8
1.4. Nichtvirale Vektorsysteme	10
1.4.1. Künstliche Chromosomen	10
1.4.2. Der Vektor pEpi-1	11
1.5. Rekombination	12
1.5.1. Das Cre/loxP-System.....	15
1.5.2. Das Flp/FRT-System	16
1.6. Aufgabenstellung	18
2. Ergebnisse	19
2.1. Etablierung episomal replizierender Vektoren in CHO-K1-Zellen.....	20
2.1.1. Langzeitexpression und Stabilität der episomal replizierenden Vektoren im Vergleich zu stabil im Genom integrierten Kontrollen	24
2.2. Einfluss der Transkriptionsrichtung auf die Funktion des Replikationsursprungs und somit auf die Stabilität des episomalen Status	27
2.2.1. Die Transkription über das Transgen hinaus ist notwendig für die Aufrechterhaltung des episomalen Status eines Vektors.....	27
2.2.2. Cre-Rekombinase vermittelte Inversion der Transkriptionseinheit eines episomal replizierenden Vektors	29
2.2.2.1. Die Inversion der Transkriptionseinheit führt zum Verlust des episomal replizierenden Vektors in der Zelle.....	31
2.2.2.2. Expressionsverhalten der Subklone in Bezug auf ihren episomalen Status	32
2.2.2.3. Die Expression ist abhängig von der Transkriptionsrichtung.....	36

2.3. Exzision eines Minimalepisoms	38
2.3.1. Generierung von CHO-K1-Klonen mit definierter Kopienzahl des stabil ins Genom integrierten Vektors und anschließende Exzision	38
2.3.1.1. Rekombinase-vermittelte Exzision eines Minimalepisoms in Einzelkopieklonen	40
2.3.2. Anreicherung des Exzisionsereignisses über einen „ <i>Promotor-Trap</i> “ nach der Flp-vermittelten Exzision	43
2.3.2.1. Generierung von Klonen zur Regeneration der Expression nach Exzision.....	44
2.3.2.2. Expressionsdaten der Klone mit vollständig integrierten Konstrukten	46
2.3.2.3. Rekombinase-vermittelte Exzision eines Minimalepisoms in Subklongemischen	47
2.3.2.4. Exzision eines Minimalepisoms über verschiedene Selektionsstrategien	49
2.3.2.5. Feststellung der Exzision des Episoms in den Einzelklonen.....	50
2.3.2.6. Langzeitstabilität der Exzisionsklone bezüglich ihrer Expression und des episomalen Status ohne Selektion	54
2.4. Entwicklung einer Antikörperproduzierenden CHO-K1-Zelllinie	57
2.4.1. Überprüfung der Antikörperexpression	57
2.4.2. Generierung episomal replizierender Vektoren zur Antikörperexpression.....	59
2.4.3. Etablierung des Co-Expressionssystems	61
2.4.4. Etablierung eines Co-Expressionssystems mittels Lipofektion als Transfermethode der episomal replizierenden Vektoren	63
2.4.4.1. Expressionsanalyse der episomal replizierenden Antikörper-Vektoren in Klongemischen	65
3. Diskussion.....	68
3.1. Eine aktive Transkription ist für den Erhalt des episomal replizierenden Vektors notwendig.....	69
3.1.1. Die Rekombinase-vermittelte Inversion der Transkriptionseinheit führt zum Verlust des episomal replizierenden Vektors durch Integration	70
3.1.2. Termination der Transkription im S/MAR-Element.....	71
3.1.3. Die stabile Replikation wird durch die transkriptionsabhängige Modifikation der Chromatinstruktur erreicht	72
3.2. Die effiziente Generierung eines episomal replizierenden Vektorsystems ist abhängig von der Methode des DNA-Transfers	74

3.3. Der Einfluss der Transgenexpression auf die Replikation	75
3.3.1. Die Expression des episomal replizierenden Vektors im Vergleich zu stabil integrierten Vektoren.....	75
3.3.2. Die Expression in Abhängigkeit des Selektionsdrucks	77
3.4. Die Rekombinase-vermittelte Exzision spezifischer Vektorsequenzen aus dem Genom führt effizient zur Generierung episomal replizierender Vektoren	79
3.4.1. Vergleich der Selektionsstrategien	80
3.4.2. Exzisionsstrategien zur Generierung von Minimalepisomen.....	81
3.4.3. Die Flp-vermittelte Exzision führt effizient zur Generierung von Minimalepisomen	82
3.4.4. Erfolgsstrategien für die Exzision	84
3.5. Nutzung und Ausweitung des episomalen Vektorsystems	85
3.5.1. Strategien zur Etablierung episomal replizierender Vektoren im Co-Expressionssystem.....	86
3.5.2. Die Expressionshöhe episomaler Vektoren ist über den Selektionsdruck beeinflussbar: Aufbau eines regulierbaren Co-Expressionssystems	87
3.6. Ausblick	89
3.6.1. Generierung eines Co-Expressionssystems durch sequenzspezifische Exzision ..	89
3.6.2. RMCE zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mit Ori-Funktion	91
4. Material und Methoden	93
4.1. Geräte.....	93
4.2. Materialien	94
4.3. Allgemeine Grundtechniken	95
4.3.1. Sterilisieren.....	95
4.3.2. Phenolisierung von Nukleinsäuren.....	95
4.3.3. Fällung von Nukleinsäuren.....	95
4.3.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	96
4.3.4.1. Photometrische Bestimmung	96
4.3.4.2. Fluorometrische Bestimmung.....	96
4.4. Arbeiten mit <i>E.coli</i>.....	97
4.4.1. Verwendete <i>E.coli</i> -Stämme	97

4.4.2.	Kulturbedien für Bakterien	97
4.4.3.	Herstellung von Agarplatten	97
4.4.4.	Herstellung elektrokompetenter Bakterien.....	97
4.4.5.	Elektrotransformation von <i>E.coli</i>	98
4.4.6.	Konservieren von Bakterienkolonien.....	98
4.5.	Isolierung von Nukleinsäuren	98
4.5.1.	Plasmidisolierung im analytischen Maßstab mit der „ <i>Boiling Prep</i> “-Methode ..	98
4.5.2.	"Midi"-Plasmidpräparation (Qiagen)	99
4.5.3.	Präparative Isolierung von DNA aus <i>E.coli</i> mittels CsCl-Gradienten	100
4.5.4.	DNA-Rückgewinnung aus Gelen mit dem 'QIAquick' Gel Extraktions Kit.....	103
4.5.5.	Isolierung von hochmolekularer DNA aus Säugerzellen.....	103
4.5.6.	Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen nach dem „ <i>NucleoSpin RNA II</i> “-Protokoll (Macherey-Nagel)	103
4.6.	DNA-Modifizierung.....	104
4.6.1.	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	104
4.6.2.	Auffüllen von 5'-überstehenden Enden	104
4.6.3.	Dephosphorylierung	104
4.6.4.	Ligation von DNA-Fragmenten zur Transformation	105
4.7.	Charakterisierung von Nukleinsäuren	105
4.7.1.	„Polymerase Chain Reaction“ (PCR).....	105
4.7.2.	Sequenzierung von DNA	107
4.8.	Radioaktive Nachweismethoden	108
4.8.1.	DNA-Markierung mit dem "Rediprime DNA Labelling System"	108
4.8.2.	Klenow-Markierung	108
4.8.3.	„Southern Blotting“	108
4.8.3.1.	Hybridisierung und Waschen	109
4.8.4.	„Northern Blotting“	110
4.9.	Gelelektrophorese.....	111
4.9.1.	Agarose Gelelektrophorese	111
4.9.2.	Formaldehyd-Agarosegele	112
4.10.	Arbeiten mit eukaryontischen Zellkulturen	112
4.10.1.	Verwendete Zellen	112
4.10.2.	Medien und Lösungen	112

4.10.3. Kultivierung von Zelllinien	113
4.10.4. Passagieren	113
4.10.5. Langzeitlagerung von Zellen	113
4.10.6. Gentransfermethoden.....	114
4.10.6.1. Transfektion mittels „GenePORTER™2 Transfection Reagent“ (Pepclab)	114
4.10.6.2. Transfektion mittels Elektroporation	114
4.10.7. Durchführung einer Selektion	115
4.11. Proteinanalytik.....	115
4.11.1. Nachweis von GFP	115
4.11.1.1. ... im Fluoreszenzmikroskop	115
4.11.1.2. ... im FACS	115
4.11.2. Nachweis von DsRed im FACS	116
4.11.3. IgG-Nachweis durch ELISA („ <i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i> “)	116
4.11.4. Intrazelluläre Antikörperfärbung und Nachweis im FACS	117
4.12. Primer	119
4.13. Vektoren	120
5. Abkürzungen	123
6. Literatur	127

Zusammenfassung

Der gerichtete, effiziente Transfer eines therapeutischen Gens in eine Zielzelle ohne toxische oder immunogene Nebenwirkungen ist eines der wichtigsten Ziele in der Gentherapie. Prinzipiell ist es möglich, beliebige heterologe DNA-Sequenzen in eine Zielzelle einzubringen und zu exprimieren. Um eine gerichtete und effiziente Transgenexpression zu erreichen, ohne das Risiko einer Insertionsmutagenese oder einer immunogenen Reaktion beispielsweise durch virale Vektoren einzugehen, wird in der vorliegenden Arbeit der Prototyp eines episomal replizierenden Vektorsystems charakterisiert und seine Wirkungsweise in unterschiedlichen experimentellen Ansätzen untersucht.

Der episomal replizierende Vektor pEpi-1 basiert auf den Eigenschaften einer S/MAR-Sequenz und nutzt durch deren Affinität zur Kernmatrix den endogenen Replikationsapparat der Wirtszelle. Von S/MAR-Elementen ist bekannt, dass sie strukturgebende Funktionen bei der Organisation des Chromatins, sowie eine damit verbundene Regulation der Expression ausüben. In dem episomal replizierenden Vektorsystem konnte anhand einer Rekombinase-vermittelten Inversion der Transkriptionseinheit gezeigt werden, dass nur durch eine transkriptionsbedingte Konformationsänderung der S/MAR-Sequenz eine stabile Replikation gewährleistet werden kann. Das S/MAR-Element liefert in diesem Vektor zudem die notwendigen Sequenzen zur Replikationsinitiation.

Eine Verbesserung der Expressionseigenschaften des episomal replizierenden Vektors konnte durch eine Deletion der prokaryontischen Sequenzen einschließlich des Selektionsmarkers erreicht werden. Dabei wurde ein auf einer Flp-Rekombinase basierendes Konzept entwickelt, welches durch die spezifische Exzision bestimmter Vektorsequenzen aus einem im Genom integrierten Konstrukt zur Definition der für einen episomal replizierenden Vektor minimal notwendigen Elemente beitragen konnte.

Um den universellen Einsatz und die Leistungsfähigkeit des episomalen Vektorsystems zu bestimmen, wurde weiterhin ein Austausch des im Vektor pEpi-1 vorhandenen eGFP-Gens durch die leichte bzw. schwere Kette eines IgG-Moleküls durchgeführt. Dieser Ansatz wurde insbesondere deshalb ausgewählt, um den Ausbau auf ein Co-Expressionssystem durchzuführen und dies mit vorhandenen Expressionsstrategien vergleichen und bewerten zu können. Dabei konnte anhand unterschiedlicher DNA-Transfermethoden dargestellt werden, dass eine Co-Expression zweier episomal vorliegender Vektoren in CHO-K1-Zellen möglich und über den Selektionsdruck regulierbar ist.

1. Einleitung

1.1. Die Organisation des Chromatins im Zellkern

In Eukaryonten ist die Erbinformation in Form der DNA zum Großteil in den Chromosomen des Zellkerns lokalisiert. Das genetische Material einer humanen Zelle besteht aus $3 \cdot 10^9$ Basenpaaren, wobei der diploide Chromosomensatz im ausgestreckten Zustand eine Länge von etwa zwei Metern besitzt. Die Unterbringung dieser großen DNA-Menge im Zellkern und der geordnete Ablauf genetischer Prozesse erfordert eine hoch organisierte Komprimierung und Strukturierung durch die Assoziation der DNA mit verschiedenen Proteinen. Die genomische DNA bildet zusammen mit den Histonproteinen das so genannte Chromatin. Mikroskopisch sind dabei zwei unterschiedlich stark kondensierte Formen des Chromatins erkennbar. Als „Euchromatin“ werden Bereiche bezeichnet, die während der Interphase im Zellzyklus nur schwach kondensiert vorliegen und in denen eine aktive Gentranskription stattfindet. Das viel dichter erscheinende „Heterochromatin“ liegt dagegen während des gesamten Zellzyklus stark kondensiert vor und ist transkriptionell inaktiv. Durch diese unterschiedliche Strukturierung der DNA im Zellkern wird die Zugänglichkeit einzelner DNA-Bereiche und somit deren Expression beeinflusst.

Die erste Verpackungsstufe des Chromatins (s. Abb. 1.1) bilden die Nukleosomen, in welchen jeweils 146 Basenpaare der rechtsgängigen Doppelhelix im linken Drehsinn um ein Oktamer aus den Histonproteinen H2A, H2B, H3 und H4 gewunden sind (Richmond et al., 1984). Dadurch wird eine 6- bis 7-fache Komprimierung der DNA erreicht. Die Histone üben hierbei sowohl eine strukturelle als auch eine regulatorische Funktion aus. Die Acetylierung des Lysinrestes der aminoterminalen Domäne eines Histons kann zu einer Abschwächung der positiven Ladung des Proteins und somit zu einer Verringerung der Bindungsstärke des DNA-Histon-Komplexes führen (Spencer und Groudine, 1997; Wade et al., 1997; Davie, 1998). Dadurch wird der Zugang der Transkriptionsmaschinerie zur DNA erleichtert (Bode et al., 1986; Wolffe und Pruss, 1996). Gegenspieler der Histonacetyltransferasen sind Histondeacetylasen, welche durch das Protein MeCP2 rekrutiert werden und über dessen Bindung an methylierte DNA-Bereiche (CpG-Inseln) eine Inhibition der Transkription herbeiführen können (Nan et al., 1998; Bestor, 1998). Die Transkriptionsvorgänge der nukleosomalen DNA werden nicht nur durch die Modifikation der Histone, sondern auch durch die Festlegung ihrer Position beeinflusst. Regulatorische

Genbereiche sind meist frei von Histonen. Diese Positionierung von Nukleosomen kann durch die bereits beschriebenen Histonmodifikationen hervorgerufen werden. Zudem erleichtern bestimmte Sequenzabfolgen, z.B. AT-reiche Motive, die Windung der DNA um die Histonproteine (Simpson, 1986; Travers, 1987).

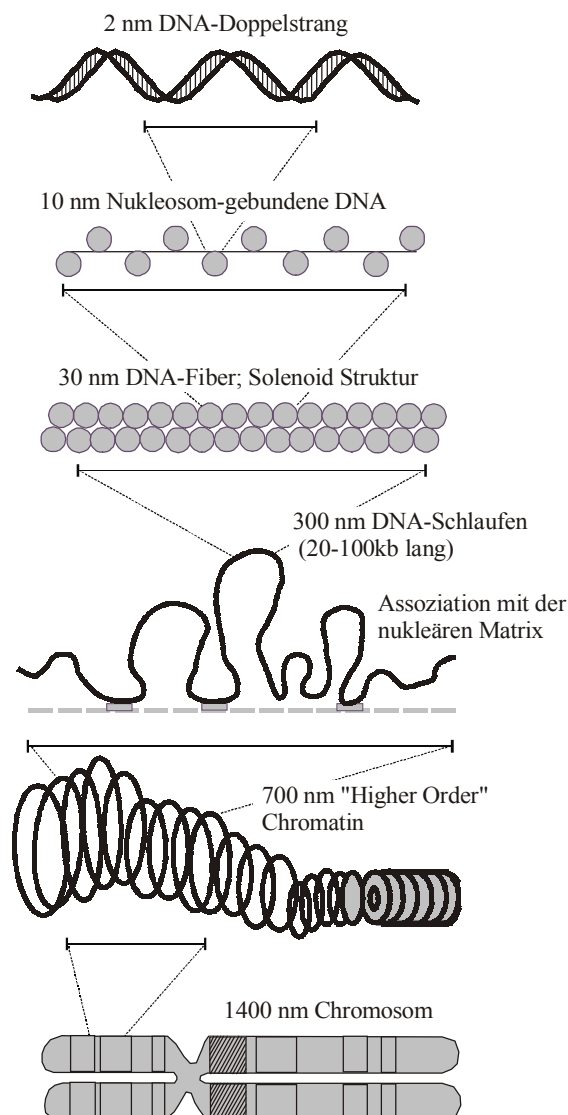


Abb. 1.1: Die Organisation des Chromatins.

Die chromosomale DNA ist an Nukleosomen gebunden und bildet somit eine Solenoidstruktur aus. Diese ist in Schleifen angeordnet, an deren Basis eine Verknüpfung mit der nukleären Matrix über S/MAR-Elemente stattfindet.

Durch die Bindung eines weiteren Proteins, des Histons H1, an den Abschnitt zwischen zwei Nukleosomen („linker“-DNA) wird eine weitere Verpackungsstufe der DNA erreicht. Dies geschieht über Wechselwirkungen zwischen den einzelnen H1-Molekülen, wodurch es zur Ausbildung der so genannten 30 nm-Faser kommt und eine weitere

Komprimierung der DNA um das 40-fache stattfindet (Felsenfeld and McGhee, 1986). Das populärste Modell zur räumlichen Anordnung der Nukleosomen wurde von Finch und Klug (1976) als Solenoid-Modell vorgestellt. Dabei ist die Nukleosomenkette spiralförmig aufgewickelt, wobei jeweils 6 bis 8 Nukleosomen eine Windung ausbilden, bei der die H1 Histone im Inneren des somit entstandenen Nukleosomenzylinders verbleiben und durch ihre starken elektrostatischen Wechselwirkungen untereinander eine Stabilisierung der 30 nm-Faser bewirken. Diese wird somit unzugänglich für regulatorische Proteine und bildet einen transkriptionell inaktiven Bereich aus.

Die nächst höhere Verpackungsstufe der DNA zeichnet sich durch die schlaufenförmige Anheftung von DNA-Domänen einer Größe von 5 bis 200 kb an die Kernmatrix aus. Diese Schlaufen sind im Metaphasechromosom extrem dicht in radialer Anordnung zueinander gepackt. Dabei ist jede Schlaufe sowohl topologisch als auch regulatorisch eine eigenständige Einheit. Die Kernmatrix ist ein Gerüst aus Nichthistonproteinen und RNA. Eine Isolierung dieses Netzwerks aus dem Zellkern kann durch eine von Berezney et al. (1974) beschriebene Hochsalzextraktion vorgenommen werden. Eine schonendere Extraktion bei physiologischen Ionenstärken mit dem Detergenz-ähnlichen LIS-Salz (Lithium-3',5'-diiodosalicylat) wurde von Mirkovitch et al. (1984) etabliert. Abhängig von der verwendeten Extraktionsmethode wird das Proteingerüst, an dem die Chromatinschlaufen angeheftet sind, als Kernmatrix („*nuclear matrix*“, Berezney und Coffey, 1974) oder als Kerngerüst („*nuclear scaffold*“, Paulson und Laemmli, 1977) bezeichnet.

Die Kernmatrix enthält sowohl strukturgebende Proteine, wie die Lamine A-C (Ludérus et al., 1992 und 1994) als auch regulatorisch wirksame Proteine, wie die DNA-Polymerasen α und β (Foster und Collins, 1985), die RNA-Polymerase II (Lewis et al., 1984), die DNA-Methyltransferase (Burdon et al., 1985) und Histondeacetylasen sowie Acetyltransferasen (Hendzel et al., 1991 und 1994). Zudem ist die Topoisomerase II das in vielen Zellen am häufigsten auftretende Enzym des Proteinnetzwerks (Gasser et al., 1986; Mirkovitch et al., 1988), welches sowohl strukturelle als auch regulatorische Funktionen ausübt. Durch die Einführung von Doppelstrangbrüchen kann die Topoisomerase II topologische Spannungen der DNA auflösen und nimmt somit Einfluss auf die Struktur und die damit verbundene Zugänglichkeit der DNA und die Genexpression. Weitere Kernmatrix-Proteine sind SAF-A/hnRNP-U (Roemig et al., 1992), SAF-B (Renz und Fackelmayer, 1996), SAT-B1 (Dickinson et al., 1992 und 1997) und ARBP/MeCP2 (von Kries et al., 1991 und Weitzel et al., 1997), welche an der RNA-Verpackung, „*Splicing*“ oder Methylierung beteiligt sein können. Für die Proteine SAF-A und SATB1 wurde eine *in vivo*-Bindung an bestimmte DNA-Bereiche nachgewiesen (de Belle et al., 1998; Fackelmayer, 1994), welche für die Verankerung der DNA mit der Kernmatrix verantwortlich sind und somit

die Schlaufenstruktur des Chromatins ausbilden. Diese DNA-Sequenzen werden als „*Scaffold/Matrix Attachment Regions*“ (S/MARs) bezeichnet. Der Aufbau des Kerngerüsts aus verschiedenen strukturgebenden und regulatorisch wirksamen Proteinen führte zu der gängigen Annahme, dass die Kernmatrix als Plattform für unterschiedlichste im Zellkern ablaufende Prozesse dient, in der DNA, RNA und Proteine räumlich miteinander verbunden werden.

1.1.1. Scaffold/Matrix Attachment Regions (S/MARs)

Zur ursprünglichen Identifizierung der S/MAR-Elemente wurden zwei unterschiedliche biochemische Verfahren angewendet. Die in Kapitel 1.1 bereits erwähnte LIS-Extraktion führt zu einer von Histonen und anderen Proteinen befreite Kernmatrix, die von einer als „Kern-Halo“ bezeichneten Wolke aus genomischer DNA umgeben ist. Die Abtrennung der DNA durch Restriktionsenzyme führt zur Detektion der abgetrennten Bereiche in der Southern Blot Analyse und wird als „*halo-mapping*“ bezeichnet. Die somit identifizierten DNA-Sequenzen wurden von Gasser und Laemmli (1986) als SAR-Elemente eingeführt. Diesen standen die MAR-Elemente (Cockerill und Garrard, 1986) gegenüber, die durch die Affinität der zu untersuchenden DNA-Abschnitte zur Kernmatrix *in vitro* gefunden wurden. Bei diesem so genannten Reassoziationsexperiment wird die Kernmatrix mit den zu untersuchenden DNA-Bereichen in Gegenwart prokaryontischer Kompetitor-DNA inkubiert und ihre Bindungsstärke überprüft (Kay und Bode, 1995). Mittlerweile hat sich herausgestellt, dass durch die beiden vorgestellten Methoden zur Isolierung dieser DNA-Abschnitte die gleichen Elemente nachgewiesen werden können. Daher wurde der Begriff S/MARs für Kernmatrix-bindende DNA-Bereiche geprägt.

Bisher konnten S/MARs aus allen untersuchten eukaryontischen Organismen isoliert werden. Sie wurden in der Hefe (Amati und Gasser, 1990), der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Mirkovitch et al., 1984; Gasser und Laemmli 1986) und in verschiedenen Pflanzen wie Tabak (Hall et al., 1991), Petunie (Dietz et al., 1994), Mais und *Arabidopsis thaliana* (Paul und Ferl, 1998) gefunden und charakterisiert. Zu den aus tierischen Organismen isolierten S/MARs gehören beispielhaft die Elemente aus der Lysozymdomäne des Huhns (Phi-Van und Strätling, 1988) und aus den Loci der murinen Immunglobulin- und β -Interferongene (Cockerill et al., 1986, 1987 und 1990). Beim Menschen wurden im β -Interferon-Locus (Mielke et al., 1990; Bode und Maaß, 1988), der Apolipoprotein B Domäne (Levy-Wilson und Fortier, 1989), sowie im β -Globin-Gencluster (Jarman und Higgs, 1988) S/MAR-Elemente identifiziert.

S/MAR-Elemente sind meist an den Domänengrenzen kodierender DNA-Bereiche lokalisiert, es konnten aber auch in den Introns einiger Gene S/MARs gefunden werden (Mielke et al., 2002; Cockerill et al., 1987; Jarman und Higgs, 1988). Eine Konsensussequenz konnte nicht identifiziert werden. S/MARs zeichnen sich jedoch durch einen hohen AT-Gehalt von etwa 70 % aus und besitzen eine Länge von 200 bis 3000 Basenpaaren. Trotz nicht vorhandener Sequenzhomologien zwischen verschiedenen S/MAR-Elementen, konnten einige häufig auftretende Sequenzmotive, wie Topoisomerase II-Bindungsstellen (Käs und Laemmli, 1992), ein ATATTT-Motiv (Cockerill und Garrard, 1986; Mielke et al., 1990), sowie poly(dAdT)-Bereiche, als „*bending*“ bezeichnete gebogene DNA-Konformationen (Anderson, 1986; von Kries et al., 1991) und „*inverted repeats*“ (Boulikas, 1995) aufgezeigt werden. Eine nachgewiesene hohe Tendenz von S/MAR-Elementen zur Strangtrennung, welche mit der Matrixbindung korreliert und die Ausbildung von Sekundärstrukturen ermöglicht (Bode et al., 1986 und 1992), diente als Grundlage zur Entwicklung von computergestützten Vorhersageprogrammen für S/MAR-Elemente („*Stress Induced Duplex Destabilization Profile*“, SIDD, Benham et al., 1997 und „*MAR-Finder*“, Singh et al., 1997).

Im genomischen Kontext dienen S/MARs häufig als Domänengrenzen, die das Genom in unabhängige Bereiche unterteilen, diese von außerhalb liegenden Einflüssen abschirmen und somit eine Art Isolatorfunktion ausüben (Namciu et al., 1998). Als weitere Funktion von S/MAR-Elementen ist die transkriptionelle Förderung zu nennen, die nur nach stabiler Integration eines Transgens, nicht jedoch im transienten Zustand nachgewiesen werden konnte und sich damit von einer Enhancerwirkung unterscheidet (Klehr et al., 1991 und Bode et al., 1995). S/MARs können zudem eine *de novo* Methylierung verhindern, wodurch ebenfalls eine stabile Langzeitexpression eines Gens ermöglicht wird (Dang et al., 2000). Es wurde eine determinierende Rolle der S/MARs für die Zelltyp spezifische Expression bestimmter Gene gezeigt (Bonifer et al., 1994; McKnight et al., 1992). Die Identifizierung und Charakterisierung von eukaryontischen Replikationsursprüngen („*Origin of Replication*“, Ori) zeigte, dass deren Sequenzeigenschaften zum Teil mit denen von S/MAR-Elementen übereinstimmen. In *Drosophila* und am DHFR-Locus des Hamsters konnte eine Kolo-kalisierung von Oris und S/MAR-Elementen gezeigt werden (Amati und Gasser, 1990; Dijkwel und Hamlin, 1995). Zudem konnte eine permanente Assoziation von Replikationsursprüngen mit der Kernmatrix ebenso wie für S/MARs nachgewiesen werden (Carri et al., 1986).

1.2. Die DNA-Replikation

Die Replikation zur identischen Vermehrung des genetischen Materials einer Zelle dient der Duplizierung des genetischen Materials und dessen Verteilung auf die Tochterzellen nach der Mitose. Sowohl bei Prokaryonten als auch bei Eukaryonten beginnt die DNA-Replikation an spezifischen Sequenzen, die als „*Origin of Replication*“ bezeichnet werden und als Bindungsstelle für Proteine dienen, die den Replikationsprozess initiieren. In *E. coli* wurde ein 245 bp-großer Replikationsursprung identifiziert, an welchem das Initiatorprotein *dnaA* mit der Entwindung der DNA und der Rekrutierung von weiteren DNA-Synthese Proteinen die Replikation einleitet (s. Abb. 1.2). Die DNA-Polymerase α kann durch ihre zusätzliche Primaseaktivität die neuen DNA-Stränge synthetisieren, wobei zwei Replikationsgabeln in beide Richtungen vom Ori aus gebildet und die zirkulären DNAs schließlich durch eine DNA-Ligase wieder geschlossen werden. In verschiedenen Viren, wie z.B. im SV40 kommt es durch die Bindung eines Virus-kodierten Proteins mit Helikase-Aktivität an den 64 bp-großen Ori zur Replikationsinitiation. Zelluläre DNA-bindende Proteine stabilisieren die entwundene DNA und synthetisieren die neue virale DNA (s. Kapitel 1.3). Für die Replikation des wesentlich größeren humanen Genoms sind mehrere „*Origins of replications*“ notwendig. Diese kommen in Intervallen von etwa 50 bis 300 kb vor, wodurch eine Gesamtanzahl von 30000 Oris auf den Chromosomen verteilt vorliegt. Diese Oris sind meist AT-reich und liegen normalerweise außerhalb kodierender Regionen. Am besten wurden die eukaryontischen Replikationsursprünge für die Hefe als „*autonomously replicating sequences*“ (ARS) charakterisiert. Diese ARS dienen als Bindungsstelle für den „*origin recognition complex*“ (ORC), durch den wiederum weitere Proteine zur Initiation der DNA-Replikation rekrutiert werden. Durch die Dissoziation so genannter „*licensing factors*“ nach der Initiation der Replikation wird gewährleistet, dass die DNA-Synthese nur einmal pro Zellzyklus ablaufen kann (Übersicht in Coverley und Laskey, 1994; Bell und Dutta, 2002).

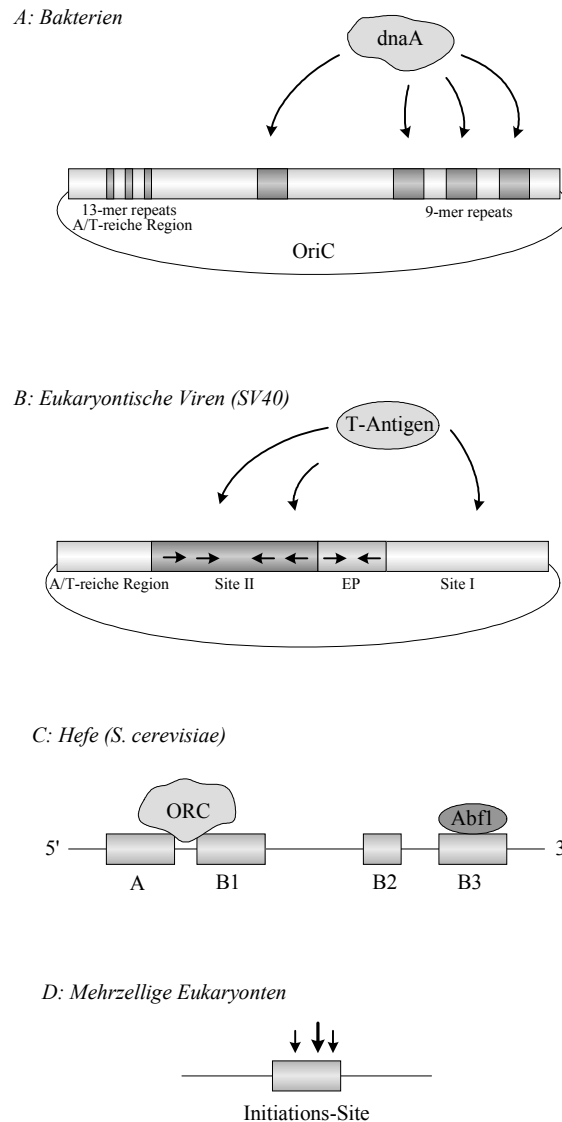


Abb. 1.2: Initiation der DNA-Replikation (nach Méchali, 2001).

A: Den Prototyp eines Replikons stellt der bakterielle OriC dar. Das Replikationsinitiationsprotein *dnaA* bindet spezifisch an die 9-mer Sequenzen. An den drei 13-mers kommt es zur Bildung eines offenen Komplexes und zur Helikasebindung. **B:** Site II ist die Haupteerkennungsstelle des Large-T Antigens des SV40. EP= Early Palindrome. **C:** In der Hefe bindet der ORC zunächst an Domäne A und B1. Die Domäne B2 enthält leicht entwindbare Sequenzen und B3 dient als Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Abf1 („ARS-binding factor 1“). **D:** Mehrzellige Eukaryonten besitzen ortsspezifische und A/T-reiche Oris unterschiedlicher Größe und liegen meist ausserhalb kodierender Regionen.

1.3. Virale Vektorsysteme

In der Gentherapie, sowie in der biotechnologischen und medizinischen Forschung, spielen sowohl der effiziente Transfer von relevanten DNA-Abschnitten als auch deren adäquate Expression in der Zielzelle eine zentrale Rolle. Unter Gentherapie versteht man das Einbringen von Genen in somatische Zellen zur Heilung oder Linderung genetischer Defekte oder erworbener Krankheiten. Sie kann dort eine Anwendung finden, wo herkömmliche oder wenig effiziente Methoden nicht zu dem gewünschten Behandlungserfolg führen. Erfolgt der Gentransfer durch die genetische Veränderung entnommener Zellen und deren Rückführung in den Organismus, so spricht man von einer *ex vivo* Gentherapie. Der direkte Transfer fremden genetischen Materials in den Organismus wird als *in vivo* Gentherapie bezeichnet. Die Übertragung fremden genetischen Materials in eine Wirtszelle kann grundsätzlich durch verschiedene Mechanismen erfolgen. Für Zellkulturansätze erfolgt der DNA-Transfer z. B. über DNA-Kalziumphosphat-Copräzipitation, Elektroporation, Lipofektion oder Mikroinjektion. Für gentherapeutische Anwendungen finden jedoch hauptsächlich virale Systeme Verwendung. Vektoren, die bislang in der Klinik getestet wurden, basieren auf Retroviren, Adenoviren, Adeno-assoziierten Viren, Vaccinia-Viren, Camarypox-Viren und Herpes-Simplex-Viren (Übersicht in Romano et al., 2000). Viren sind darauf spezialisiert, bestimmte Zellen zu infizieren und ihr genomisches Material in die Wirtszelle einzubringen um es dort zu exprimieren. Damit es bei einem auf viralen Vektoren basierenden Gentransfer nicht zum Ausbruch einer Virusinfektion kommen kann, werden modifizierte, z.B. replikationsdefiziente Virusstämme benutzt. Abhängig vom therapeutischen Ziel einer Gentherapie wird das am besten geeignete Vektorsystem bestimmt. So bieten auf Retroviren basierende Vektoren eine dauerhafte Expression eines Transgens, da diese in das Wirtsgenom stabil integrieren. Diese Integration erfolgt jedoch nur in sich teilende Zellen. In Mäusen wurde gezeigt, dass retrovirale Vektoren Leukämie induzieren können (Li et al., 2002), auch wurden Zwischenfälle bei Therapien am Menschen bekannt (Marshall et al., 2001). Zudem kann es bei der Integration der vektoriellen Sequenzen zu einer Insertionsmutagenese kommen. Adenovirale Vektorsysteme integrieren hingegen nicht in das zelluläre Wirtsgenom, sondern replizieren extrachromosomal. Dadurch kann eine hohe Expression eines Transgens erreicht werden, die jedoch nur über einen kurzen Zeitraum stabil bleibt (Engelhardt et al., 1993). Für eine stabile Expression über einen längeren Zeitraum wären daher wiederholte Infektionen der Zellen notwendig. Dies kann zu starken immunogenen Reaktionen des Wirtsorganismus führen (Yang et al, 1994).

Aufgrund der beschriebenen Nachteile viraler Vektoren wurden weitere Vektoren für den Einsatz in der Gentherapie entwickelt, deren Funktion auf einem viralen Plasmidreplikon basiert. Der Transfer von solcher nackter DNA, die auch in Liposomen verpackt in die Zellen eingebracht werden kann, ist im Gegensatz zu einer Virusinfektion relativ ineffizient. Jedoch besitzen diese Vektoren eine durch das virale Plasmidreplikon vermittelte Fähigkeit zu einer stabilen, episomalen Replikation in der Zielzelle. Diese Vektoren basieren auf Elementen episomal replizierender Viren, wie dem Epstein-Barr Virus (EBV, Gahn und Schildkraut, 1989), dem Bovinen Papilloma-Virus (BPV, Lehman und Botchan, 1998), dem Kaposi Sarkom assoziierten Herpesvirus (KSHV, Ballesta et al., 1999) oder dem Simian Virus 40 (SV40, Fanning und Knippers, 1992; Wessel et al., 1992). Bei den verwendeten Elementen handelt es sich in den meisten Fällen um den jeweiligen viralen Replikationsursprung und um ein transaktivierendes Protein, welches an den Replikationsursprung binden kann. Diese bewirken die Replikation des Vektors während des Zellzyklus, sowie die gleichmäßige Verteilung des Konstrukts auf die Tochterzellen bei der Mitose (Shirakata und Hirai, 1998; Calos, 1998). Das Plasmidreplikon des SV40 besteht aus dem SV40-Replikationsursprung und einem Gen, welches das transaktivierende *Large T*-Antigen kodiert. Dieses Protein bindet als Hexamer an den Replikationsursprung und entwindet die DNA durch seine Helikaseaktivität, wodurch die Replikation durch die zelluläre Primase eingeleitet werden kann (Wessel et al., 1992). Zudem kann das *Large T*-Antigen direkt an das Chromatin und die Kernmatrix binden. Diese Verankerung des Vektormoleküls dient der mitotischen Stabilität dieser Konstrukte (Schirmbeck und Deppert, 1987 und 1991). Somit spielt das *Large T*-Antigen sowohl zur stabilen Replikation als auch zur Retention in der Zelle eine entscheidende Rolle. Analoge Funktionen konnten auch für das Plasmidreplikon des EBV gezeigt werden (Aiyar et al., 1998), jedoch besitzt es keine eigene Helikaseaktivität und greift daher auf die zelluläre Helikase zurück (Middleton und Sugden, 1992).

Aufgrund ihrer episomalen Stabilität besitzen Vektoren auf Basis viraler Plasmidreplikons ein hohes Potential für die Aufklärung biologischer Fragestellungen und die Anwendung in der Biotechnologie. Ein Einsatz in der Gentherapie ist jedoch nur begrenzt möglich, da diese Vektoren eine hohe Zellspezifität besitzen (Fanning und Knippers, 1992). Zudem können die transaktivierenden Proteine einen immunogenen Einfluss haben (Chen et al., 1999) und auch zur Transformation der Zielzelle führen (Suzuki et al., 1992; Cooper et al., 1997).

1.4. Nichtvirale Vektorsysteme

Eines der wichtigsten Ziele in der Gentherapie ist der gerichtete, effiziente Transfer eines therapeutischen Gens in eine Zielzelle ohne toxische oder immunogene Nebenwirkungen. Zudem kann eine Regulation der Transgenexpression in bestimmten therapeutischen Ansätzen vorteilhaft sein. Der ideale Vektor für die Gentherapie sollte diese Anforderungen erfüllen und zudem in hohen Konzentrationen leicht und reproduzierbar herzustellen sein. Prinzipiell kann jede heterologe DNA in eine Zielzelle eingebracht und exprimiert werden (Hengge et al., 1996). Diese DNA muss jedoch in der Zelle replizieren können, um nicht im Laufe der Zeit abgebaut oder herausverdünnt zu werden.

1.4.1. Künstliche Chromosomen

Die Etablierung künstlicher Chromosomen konnte durch die Charakterisierung der funktionellen chromosomalen Elemente Telomer, Centromer und Replikationsursprünge, zunächst für die Hefe durchgeführt werden (YACs, „*Yeast Artificial Chromosomes*“, Murray und Szostak, 1993). Weiterführende Experimente erbrachten schließlich den ersten Prototyp eines künstlichen Chromosoms für eine Anwendung im Mammaliengenom (MACs, „*Mammalian Artificial Chromosomes*“, Harrington et al., 1997). Die zahlreichen bislang konstruierten MACs basieren auf den funktionellen Elementen der natürlich vorkommenden Chromosomen (Ascenzioni et al., 1997; Lipps und Bode, 2001; Grimes et al., 2002). Zur Herstellung künstlicher Chromosomen existieren zwei verschiedene Prozeduren. In der so genannten „*top down*“-Methode wird ein bestehendes Chromosom durch Bestrahlung oder durch eine Transfektion mit klonierten Telomer-DNAs fragmentiert (Farr et al., 1992; Heller et al., 1996). Hiermit konnten MACs mit einer Größe zwischen 0,5 und 6 Megabasenpaaren hergestellt werden (Saffery et al., 2001; Wong et al., 2002). Diese besitzen eine stabile, meist lineare Struktur und bestehen hauptsächlich aus Centromer-DNA (Auriche et al., 2001). Die alternative „*bottom up*“-Methode basiert auf der Co-Transfektion willkürlich zusammengesetzter DNA-Sequenzen. Dabei wurden von Willard et al. synthetische α -Satelliten-, Telomer- und Centromer-DNA-Abschnitte in die humane Zelllinie HT1080 eingebracht, wodurch eine *de novo* Generation artifizieller Chromosomen zustande kam (Harrington et al., 1997). Diese auch als HACs („*Human Artificial Chromosomes*“) bezeichneten etwa 6 Megabasenpaare langen DNA-Moleküle

sind mitotisch stabil und in der Lage, funktionelle zelluläre Faktoren zu rekrutieren (Westphal et al., 1998; Ebersole et al., 2000). Der Einsatz solcher *de novo* generierten Chromosomen für gentherapeutische Fragestellungen ist prinzipiell möglich, wie mit der Komplementierung des HPRT-Locus in HPRT-defizienten HT1080-Zellen gezeigt werden konnte (Grimes et al., 2002 und Mejia et al., 2001), jedoch ist ihre Struktur an sich wenig definiert. Zudem sind die künstlich generierten Chromosomen mit einer Größe im Megabasenpaarbereich für die molekularbiologische Anwendung eher ungeeignet.

1.4.2. Der Vektor pEpi-1

Der Mangel an sicheren Vektorsystemen für die Gentherapie lässt weitere Versuche zur Entwicklung linearer und zirkulärer Vektoren für den Einsatz bei gentherapeutischen und ebenso bei grundlagenorientierten Fragestellungen sinnvoll erscheinen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher ein bereits etabliertes Vektorsystem weiterführend modifiziert, von dem zunächst angenommen wurde, dass durch das Zusammenspiel des viralen Replikationsursprungs des SV40 mit einer chromosomalen S/MAR-Sequenz aus der 5'-Region des humanen Interferon- β -Gens eine stabile episomale Replikation in Säugerzellen resultiert (Piechaczek et al., 1999).

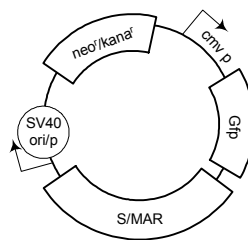


Abb.1.3: Schematische Darstellung des Vektors pEpi-1.

Der Vektor enthält eine Transkriptionseinheit, bestehend aus dem cmv-Promotor und einem GFP-kodierenden Reportergen. Ein S/MAR-Element aus dem Bereich der 5'-Region des humanen Interferon- β -Gens schließt sich daran an. Der SV40-Promotor/Origin of Replication dient der Replikation des Vektors in der Zelle, sowie der stabilen Transkription der Selektionsmarker, die eine Resistenz gegenüber G418 und Kanamycin vermitteln. Weitere nicht aufgeführte Elemente sind die HSV-TK-Polyadenylierungsstelle zur Transkription des *neo^r*-Gens in Eukaryonten, sowie der pUC19 Origin of Replication zur Vermehrung des Plasmids in *E.coli*. Eine SV40-Polyadenylierungsstelle befindet sich 3' des S/MAR-Elements.

Die S/MAR-Sequenz wurde für dieses System aufgrund der Beobachtung verwendet, dass Replikationsursprünge stets in der näheren Umgebung von S/MAR-Regionen lokalisiert

sind. Durch die Fähigkeit der Kernmatrixanheftung des S/MAR-Elements wurde angenommen, dass in dem vorliegenden System eine stabile Replikation und Segregation des Vektors auch ohne das transaktivierende *Large T*-Antigen möglich ist. S/MAR-Elemente sind nicht notwendigerweise die bevorzugten Stellen der Replikationsinitiation (Keller et al., 2002; Mesner et al., 2003). Wie oben dargestellt, spielen sie jedoch eine wichtige Rolle bei der Organisation des Chromatins (s. Kapitel 1.1.1). Für den Vektor pEpi-1 (s. Abb.1.3) konnte gezeigt werden, dass er mit mitotischen Chromosomen assoziiert im Zellkern vorliegt (Baiker et al., 2000). Diese Assoziation wird durch das Protein SAF-A vermittelt, welches eine hohe Affinität zur S/MAR-Sequenz des Vektors pEpi-1 aufweist (Jenke et al., 2002) und zu den regulatorisch wirksamen und Strukturgebenden Proteinen der Kernmatrix gehört. Diese Bindung des Vektors an die Kernmatrix vermittelt die gleichmäßige Verteilung der nach der Replikation entstandenen Vektoren auf die Tochterzellen nach der Mitose.

Von Schaarschmidt et al. konnte kürzlich gezeigt werden, dass der episomal replizierende Vektor pEpi-1 früh in der S-Phase und nur einmal pro Zellzyklus repliziert wird. Für einige Mitglieder des Pre-RCs konnte eine Bindung an den Vektor und eine funktionelle Rolle bei der Replikation nachgewiesen werden. Diese Bindungsstellen sind dabei über den gesamten Vektor verteilt. Es konnte demnach nachgewiesen werden, dass die ORC-Bindung und somit die Replikationsinitiation nicht sequenzspezifisch sind. Wie in Säugerzellen allgemein üblich, sind die Startstellen für die Replikation daher nicht durch die DNA-Sequenz determiniert, sondern durch epigenetische Faktoren. So spielen spezifisch gebundene Transkriptionsfaktoren und die Konformation des Chromatins eine wichtige, wenn auch noch nicht abschließend geklärte Rolle bei der Replikation chromosomaler DNA und auch des episomal replizierenden Vektors pEpi-1. Der aktiven Transkription des auf dem Vektor pEpi-1 befindlichen Reportergens wird daher zunehmend Beachtung geschenkt. Das Zusammenspiel der Transkription und kritischer DNA-Strukturen, wie das S/MAR-Element und der SV40-Ori des Vektors pEpi-1 wurden in der vorliegenden Arbeit weiterführend untersucht.

1.5. Rekombination

Die Rekombination ist ein in allen Organismen vorkommender, natürlicher Prozess, bei der eine Spaltung und Neuverknüpfung von DNA-Abschnitten erfolgt, wodurch ein Austausch der DNA-Sequenzen zwischen zwei Chromosomen oder DNA-Molekülen stattfindet. Dies gewährleistet eine genetische Diversität und die Reparatur geschädigter

DNA. Man unterscheidet zwischen einer homologen und einer sequenzspezifischen Rekombination. Die homologe Rekombination (s. Abb. 1.4) wurde von Holliday, 1968 zuerst beschrieben und von Meselson und Radding (1975) erweitert. Sie basiert auf der Paarung ausgedehnter homologer Sequenzen und findet in Bakterien und Hefen häufig statt. Die homologe Rekombination in Säugerzellen ist hingegen sehr selten, was möglicherweise in der Größe und Komplexität des Genoms begründet ist. Allerdings kommt es zwischen transfizierten, nicht in das Genom integrierten Plasmiden auch in Mammaliazellen häufig zu einer homologen Rekombination (Kucherlapati et al., 1984). Hierbei ist die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens zweier Plasmide relativ hoch. Zudem sind die Plasmidsequenzen frei zugänglich, da eine Assoziation mit Proteinen, wie es für genomische DNA der Fall ist, zumindest vor Durchlaufen des Zellzyklus fehlt. Die homologe Rekombination ist daher in Kultur-Zelllinien aufgrund des häufigen Auftretens illegitimer Rekombinationsereignisse ein ineffizientes Mittel zur gezielten Manipulation von genomischer DNA (Bode et al., 2000c).

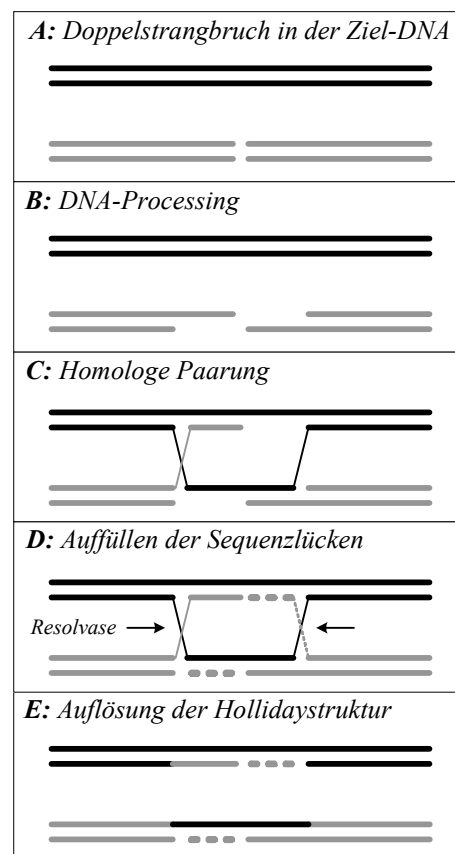


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der homologen Rekombination.

In einer der beiden DNA-Sequenzen findet ein Doppelstrangbruch statt (A), was zu einem DNA-Processing durch eine 5'-Exonuklease führt (B). Die dabei entstandenen einzelsträngigen DNA-Überhänge interagieren

mit homologen Sequenzen des anderen Doppelstranges (C). Die Sequenzlücken werden aufgefüllt und es entsteht die so genannte Holliday-Struktur (D), die von einer DNA-Resolvase aufgelöst wird (E).

Dagegen findet die sequenzspezifische Rekombination in ES-Zellen, transgenen Mäusen, Zelllinien, Pflanzen, Hefe und *Drosophila* eine breite Anwendung (Übersicht in Kilby et al., 1993). Hierfür sind keine ausgedehnten Homologien zwischen DNA-Sequenzen notwendig wie bei der homologen Rekombination. Die sequenzspezifische Rekombination verläuft über kurze Erkennungsstellen, die zuvor in das zu untersuchende zelluläre System eingebracht werden müssen. Nach dem erforderlichen Transfer eines Rekombinaseproteins kommt es zu einer basengenauen Rekombination zwischen den Erkennungsstellen. Aus der Lage und der Orientierung dieser Erkennungsstellen zueinander ergeben sich verschiedene Rekombinationsereignisse (s. Abb. 1.5; Übersicht in Bode et al., 2000c). DNA-Sequenzen können dabei spezifisch in ein Zielgenom eingebracht (*Targeting*), entfernt (*Exzision*) oder invertiert werden (*Inversion*).

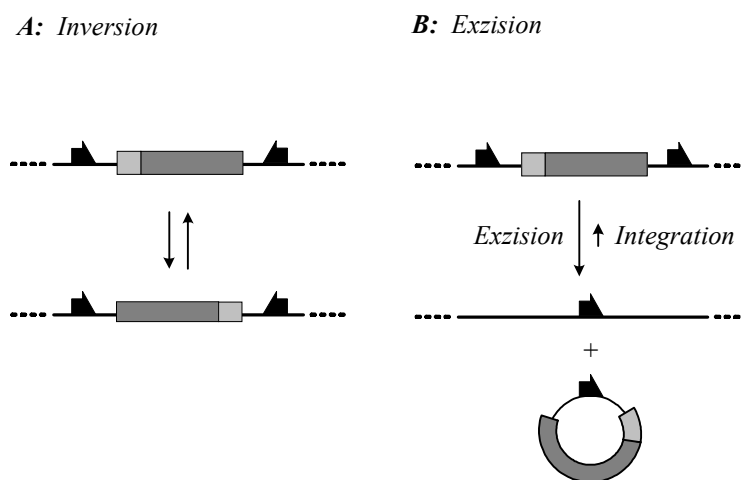


Abb. 1.5: Rekombinase-vermittelte Rekombinationsreaktionen.

A: Inversion: Liegen zwei invers orientierte Rekombinase-Erkennungsstellen vor, so kommt es zur Inversion der dazwischen liegenden DNA-Sequenz.

B: Exzision: Die intramolekulare Rekombination zwischen zwei gleichgerichteten Rekombinase-Erkennungsstellen führt zur Exzision der dazwischen liegenden DNA-Sequenz und zur Bildung eines zirkulären Produkts. Die umgekehrte und wesentlich ineffizientere Reaktion ist die Integration eines DNA-Abschnitts.

Die am häufigsten verwendeten sequenzspezifischen Rekombinationssysteme sind das Cre/loxP- und das Flp/FRT-System. Die Rekombinasen Cre und Flp gehören zur Integrase-Familie, von der bislang mehr als 30 Mitglieder bekannt sind (Übersicht in Craig, 1988

und Sadowski, 1993) und die nach der Integrase des Bakteriophagen Lambda benannt ist. Diese katalysiert die Integration und auch die Exzision des Phagen-genoms in das Wirtsgenom von *E.coli*. Für die verschiedenen Rekombinasen existieren zwar keine gemeinsamen Bindungsmotive, jedoch ist ihr Mechanismus konserviert. Im katalytischen Zentrum der Rekombinasen befindet sich die Aminosäure Tyrosin, die am Strangbruch beteiligt ist, sowie die Aminosäuren Arginin und Histidin, welche der Verknüpfung der rekombinierten DNA-Sequenzen dienen.

1.5.1. Das Cre/loxP-System

Bei der Replikation des Bakteriophagen P1 gewährleistet das Cre/loxP-System den Erhalt des Phagenplasmids in *E.coli* durch die Zerlegung der bei der Replikation entstehenden Phagendimere in Monomere. Eine loxP-Erkennungsstelle („loxP-Site“, „locus of X-over“) besteht aus einem 8 bp langen asymmetrischen Spacer, der von zwei 13 bp langen invertierten Sequenzen flankiert wird (s. Abb. 1.6).

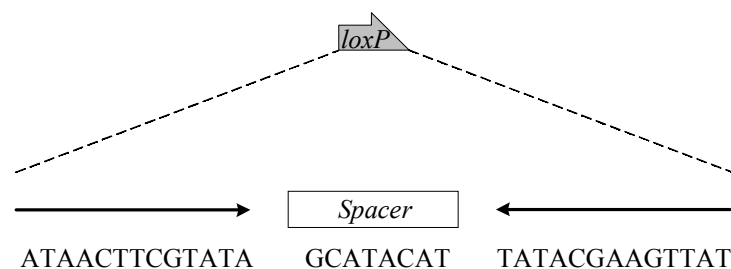


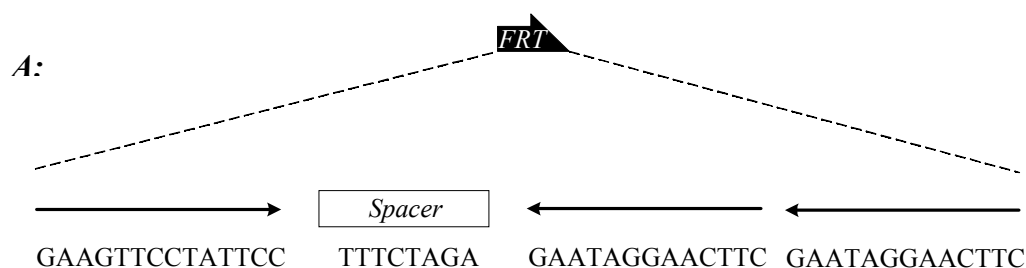
Abb. 1.6: Aufbau und Sequenz der Wildtyp loxP-Site.

Diese dienen der 38 kDa großen Cre-Rekombinase („causes recombination“), welche die Rekombinationsreaktion katalysiert, als Bindungsstellen (Hoess und Abremski, 1985). Die Asymmetrie der Spacersequenz bestimmt die Orientierung der loxP-Site und somit den Verlauf der Rekombinationsreaktion. Das Cre/loxP-System benötigt keine weiteren Cofaktoren für die Rekombination und findet daher auch in anderen Organismen Anwendung. So konnte es außer in *E.coli* auch in Hefe (Sauer und Henderson, 1990), in der Maus (Lakso et al., 1992) und in Säugerzellen (Übersicht in Kilby et al., 1993 und Sauer, 1994) etabliert werden. Insbesondere in Embryonalen Stammzellen findet das Cre/loxP-System eine Verwendung zur Entfernung von Selektionsmarkern und zum konditionellen *knock out* von bestimmten Genen in transgenen Mäusen (Übersicht in Kühn und Schwenk, 1997 und Nagy, 2000). Neben der Exzision bestimmter DNA-Sequenzen

kann das Cre/loxP-System auch zur spezifischen Integration (*Targeting*) verwendet werden (Fukushige und Sauer, 1992 und Schübeler et al. 1998). Im Mammaliagenom existieren so genannte „Pseudo-loxP“-Sites, die als Substrat für die Cre-Rekombinase dienen können (Thygarajan et al., 2000). Dies kann zu einer illegitimen Rekombination führen. So wurde in Maus-Spermatiden gezeigt, dass eine Cre-Expression zu Chromosomen-Rearrangements führt (Schmidt et al., 2000). Dieser Effekt kann jedoch durch eine transiente Expression der Cre-Rekombinase vermindert werden.

1.5.2. Das Flp/FRT-System

Viele Stämme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* enthalten das so genannte 2 μ Plasmid (Hartley und Donelson, 1980), welches durch zwei invertierte Sequenzwiederholungen in zwei Bereiche abgegrenzt ist. Bei diesen Sequenzen handelt es sich um Erkennungsstellen für die vom Plasmid kodierte 43 kDa-große Flp-Rekombinase („*flip-flop*“-Inversionsmechanismus, Broach und Hicks, 1980). Diese kann somit zwischen den invers orientierten FRT-Erkennungsstellen („*Flp-Recognition Target*“, „*FRT-Site*“) eine Rekombination herbeiführen, wobei pro Zellteilung mehrere Plasmidkonkatemere entstehen, die durch eine anschließende Rekombination in Monomere zerlegt werden (Volkert et al., 1989). Eine FRT-Erkennungsstelle besteht ähnlich wie die loxP-Site aus einer asymmetrischen, 8 bp langen Spacer-Region, welche die Orientierung der FRT-Site vorgeben und drei 13 bp langen Sequenzwiederholungen (s. Abb. 1.7, A). Diese, den Spacer flankierenden invertierten Sequenzen dienen der Flp-Rekombinase als Bindungsstelle. Hierbei erhöht die dritte Sequenzwiederholung die Rekombinogenität der FRT-Site, sie ist für Exzisionsreaktionen jedoch entbehrlich (Senecoff und Cox, 1986).



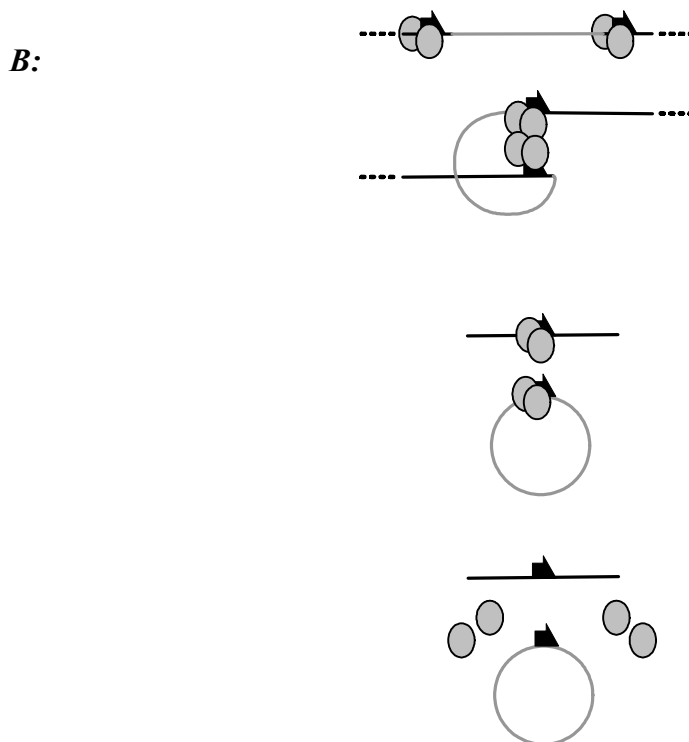


Abb. 1.7: Schematische Darstellung der FRT-Site und der Exzisionsreaktion.

A: Aufbau und Sequenz der Wildtyp FRT-Site.

B: Schematische Darstellung des Mechanismus der Exzision: Monomer-Paare der Flp-Rekombinase lagern sich an die FRT-Sites an. Es folgt eine Paarung der Rekombinasen, die Neuverknüpfung der DNA-Stränge und schließlich die Dissoziation der Rekombinase.

Dieses sequenzspezifische Rekombinationssystem findet in *E.coli* und *Drosophila*, sowie in Pflanzen- und Säugerzellen verschiedene Anwendungen (Übersicht in Kilby et al., 1993). Hierbei können von FRT-Sites flankierte Genabschnitte, wie z.B. Selektionsmarker exzidiert werden (Fiering et al., 1993). Zudem ist eine Integration von DNA-Abschnitten über singuläre FRT-Sites möglich, wobei es hierbei durch die thermodynamisch günstigere Exzisionsreaktion zumeist einer Selektionsfalle bedarf (Schübeler et al., 1998; Verhoyen et al., 1998).

Die Wildtyp-Flp-Rekombinase besitzt ihr Aktivitätsoptimum bei einer Temperatur von 25 bis 30 °C. Für Zellkulturansätze wird daher auf die von Buchholz et al., 1998 generierte thermostabilere Flp-Rekombinase Flpe (Flp-Rekombinase *enhanced*) zurückgegriffen, die bei 37 °C ihre höchste Aktivität aufweist. Somit stellt das Flp/FRT-System eine Alternative zum etablierten Cre/loxP-System dar. Zudem können beide Systeme auch parallele Anwendung z.B. zur sequenziellen Exzision oder Integration von DNA-Abschnitten finden.

1.6. Aufgabenstellung

Das Zusammenspiel von Genen und der sie umgebenden Chromatinstruktur beeinflusst fundamentale Prozesse wie DNA- und RNA-Synthese in eukaryontischen Zellen. Um eine effiziente und sichere Gentherapie in humanen Zellen durchführen zu können, müssen die molekularen Mechanismen zur Regulierung der Chromatinfunktion in natürlich vorkommender chromosomaler Umgebung für eine Fremdgenexpression reproduziert werden können. Als Durchbruch wird hier die Entwicklung nicht integrierender, zirkulärer Episomen gesehen. Der Mangel an sicheren Vektorsystemen für die Gentherapie lässt daher eine tiefgehende Analyse des in CHO-K1-Zellen bereits etablierten episomal replizierenden Vektors pEpi-1 sinnvoll erscheinen. Das detaillierte Verständnis der Mechanismen, die es diesem extrachromosomalen Vektor erlauben sich wie das zelluläre Erbmateriale zu replizieren und zu segregieren, kann der Generierung regulierter Genexpressionssysteme zur therapeutischen Anwendung dienen.

Dazu sollen Untersuchungen stattfinden, die das Zusammenspiel der funktionalen Elemente, die auf dem Vektor lokalisiert sind, aufklären, wobei insbesondere der S/MAR-Sequenz eine hohe Bedeutung für die Stabilität des episomal replizierenden Vektorsystems zukommt. S/MAR-Elemente besitzen sowohl strukturgebende Eigenschaften bei der Organisation des Chromatins als auch einen damit verbundenen Einfluss auf die Genexpression. Das Verständnis des Wirkungsmechanismus des S/MAR-Elements in diesem episomalen Vektorsystem kann somit auch der Aufklärung weiterer funktionaler Eigenschaften dieser Sequenzen dienen.

Desweiteren soll eine Optimierung der vektoriellen Eigenschaften bezüglich der Replikations- und Expressionsstabilität durchgeführt werden. Hierfür ist die sequenzspezifische Rekombination ein geeignetes Werkzeug zur gezielten Deletion bestimmter Vektorbestandteile im chromosomalen Kontext. Die minimal erforderlichen funktionalen Elemente des Vektors können somit charakterisiert werden.

Um den universellen Einsatz dieses episomalen Vektorsystems zu demonstrieren, kann eine Ausweitung auf therapeutisch relevante Expressionseinheiten stattfinden. Dabei soll gleichzeitig ein episomal replizierendes Co-Expressionssystem entstehen, welches in CHO-K1-Zellen zur Sekretion eines funktionalen IgG-Moleküls und zu dessen stabiler Expression führt.

2. Ergebnisse

Der hier vorgestellte Vektor pEpi-1 (s. Abb.1.3) stellt den Prototyp eines neuartigen Vektors für Säugerzellen dar, der über seine Affinität zur Kernmatrix den endogenen Replikationsapparat der Wirtszelle nutzt. Für die Aufrechterhaltung seines episomalen Status sind keine viralen Faktoren erforderlich. Dadurch ermöglicht er nicht nur den Aufbau spezifischer Expressionssysteme, sondern birgt auch das Potential eines idealen Vektors für die Gentherapie. Darüber hinaus repräsentiert dieser Vektor ein experimentelles Minimalsystem, an dem die Kontrolle der eukaryontischen Replikation untersucht werden kann.

Ziel dieser Arbeit war zunächst die Funktionalität des Vektors pEpi-1 bezüglich seiner Fähigkeit in CHO-K1-Zellen episomal zu replizieren und exprimieren zu bestätigen. Die Aufklärung der Zusammenhänge der auf dem Vektor befindlichen kritischen DNA-Strukturen, sowie der Zusammenhang von Transkription und Replikation sollte zur Definition einer aktiven Kombination dieser Komponenten und somit zu einer Verbesserung des Vektor-Prototyps beitragen.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde durch die Verwendung einer sequenzspezifischen FLP-vermittelten Rekombination ein System zur Generierung von Minimalepisomen etabliert. Dieses Konzept sollte sowohl die Klonierungskapazität erweitern als auch zuverlässig Vektorsequenzen prokaryontischen Ursprungs beseitigen, wodurch eine Verbesserung der Funktion des episomal replizierenden Vektors sowie seiner biologischen Sicherheit für gentherapeutische Fragestellungen angestrebt wurde.

Um den universellen Einsatz und die Leistungsfähigkeit dieses Vektorsystems nachzuweisen, wurde ein Austausch des Reportergens durch Antikörperkettengene durchgeführt. Dieser Ansatz wurde insbesondere deshalb gewählt, um den Ausbau zur Protein-Co-Expression durch parallel etablierte episomal replizierende Vektoren zu ermöglichen und mit vorhandenen Expressionsstrategien vergleichend evaluieren zu können.

2.1. Etablierung episomal replizierender Vektoren in CHO-K1-Zellen

Zur Generierung von CHO-K1-Zellen, die einen Vektor stabil episomal replizieren, wurde hier das Konstrukt pEpi-L1CG Δ pA1L verwendet (s. Abb. 2.1). Um den Einfluss der Transkriptionsrichtung auf die Funktion des Replikationsursprungs und somit auf die Aufrechterhaltung des episomalen Status zu untersuchen, wurden in den Vektor pEpi-eGfp (s. Kapitel 4.13) zwei entgegengesetzt orientierte loxP-Sites inseriert. Dadurch kann die Transkriptionseinheit durch Cre-vermittelte Rekombination invertiert werden (s. Kapitel 2.2). Für die anschließenden Expressions- und Stabilitätsuntersuchungen dieses episomal replizierenden Vektors sollten zudem geeignete Kontrollen für Vergleichsstudien geschaffen werden. Dabei wurde der Vektor pEpi-L1CG Δ pA1L stabil mit einer definierten Kopienzahl in das Genom integriert. Zudem wurde ein Vektor als Kontrolle in CHO-K1-Zellen integriert, der das S/MAR-Element nicht enthält (pGFP-C1 Δ , s. Kapitel 4.13), in seinem Aufbau aber dem oben verwendeten Vektor entspricht.

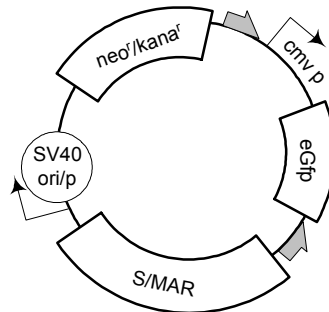


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Vektors pEpi-L1CG Δ pA1L.

Das Grundkonstrukt pEpi-eGFP wurde hier um zwei entgegengesetzt orientierte loxP-Sites (graue Halbpfeile) erweitert. Diese flankieren die aus cmv-Promotor und eGFP-Gen bestehende Transkriptionseinheit.

Zunächst wurde der Vektor pEpi-L1CG Δ pA1L in CHO-K1-Zellen elektroporiert und diese anschließend mit G418 selektiert. Es wurden insgesamt 79 resistente Klone isoliert und diese bezüglich eines episomalen Vorliegens des Vektors in der Zelle überprüft. Der Nachweis auf einen episomal replizierenden viralen Vektor wird standardmäßig über die DNA-Extraktion nach Hirt, 1967 durchgeführt. Da es sich bei pEpi-eGFP um einen Vektor handelt, für den beschrieben wurde, dass er in etwa 6 bis 14 Kopien in der Zelle vorliegt

(Baiker et al., 2000), ist die Hirt-Extraktion für dieses System eher ungeeignet. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Nachweis eines episomal replizierenden Vektors mittels PCR und Southern Blot Analyse an der aus den Zellen isolierten Gesamt-DNA durchgeführt. Dadurch konnte zwischen einem integrierten und episomalen Zustand direkt unterschieden werden, wohingegen beim Nachweis mittels Hirt-Extraktion eine mögliche zusätzliche Integration nicht detektiert werden kann.

Der Nachweis eines episomal vorliegenden Vektors mittels PCR erfolgte unter Zuhilfenahme eines Primerpaares, welches die Amplifikation eines größtmöglichen Anteils des Vektors ermöglicht.

Durch die Verwendung des Primerpaares *neofwd2/neorev2* (s. Abb. 2.2, B), deren Differenz ihrer 5'-Enden aus nur 97 Basenpaaren besteht, kann ein PCR-Produkt mit einer Größe von 7,2 kb aus der genomischen DNA, der den Vektor pEpi-L1CGΔpA1L enthaltenen Zellen amplifiziert werden. Analog hierzu konnten auch die Primerpaare *sarfwd/sarrev* und *gfpwd1/gfprev1* (s. Kapitel 4.12) als zusätzliche Absicherung verwendet werden.

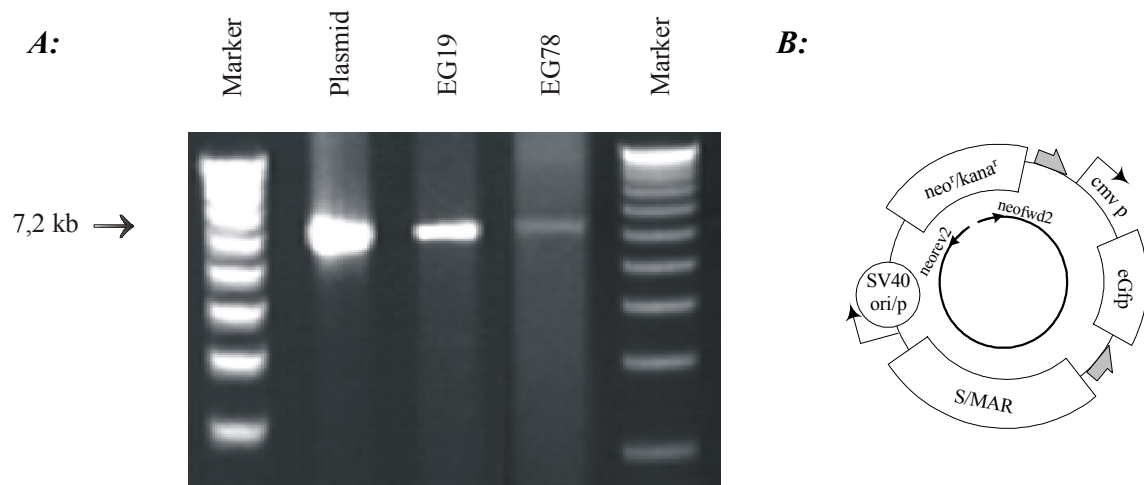


Abb. 2.2: Nachweis des episomal replizierenden Vektors mittels PCR.

A: Nachweis eines episomal replizierenden Vektors in CHO-K1-Einzelklonen. Die Gesamt-DNA der Einzelklone EG19 und EG78 wurde isoliert und für die Amplifikation des Vektors in der PCR-Analyse verwendet. Das spezifische Fragment mit einer Größe von 7,2 kb wurde sowohl für die Plasmid-Kontrolle als auch für die Klone EG19 und EG78 generiert. Marker: 1 kb-Leiter (Gibco).

B: Schematische Darstellung des Vektors pEpi-L1CGΔpA1L. Durch die Verwendung des Primerpaares *neofwd2/neorev2* kann ein größtmöglicher Anteil des Plasmids durch eine PCR-Reaktion amplifiziert werden.

Aufgrund von Einzelstrangbrüchen, die während des Elektroporationsvorgangs induziert werden können oder durch die Plasmidpräparation aus Bakterien entstehen, kann es zu einer Integration des zirkulär eingebrachten Vektors in das zelluläre Genom kommen.

Dabei besteht die Möglichkeit einer Tandemintegration des Konstrukts. Kommt es dabei zu einer *head-to-tail*-Anordnung, kann bei der Überprüfung des episomalen Status eines Vektors mittels PCR nicht mehr zwischen einem Episom und einer Tandemintegration unterschieden werden, da in beiden Fällen der gesamte Vektor amplifiziert wird. Aus diesem Grund kann die PCR nur als zusätzliche Absicherung eines im Southern Blot identifizierten episomalen Klons dienen.

Für die Southern Blot-Analyse wurde ebenfalls die Gesamt-DNA isoliert und mit dem Restriktionsenzym HindIII geschnitten. Dieses Enzym besitzt eine einzige Erkennungsstelle im Vektor pEpi-L1CGΔpA1L. Durch die Verwendung einer gegen das gesamte Plasmid gerichteten DNA-Sonde entsteht bei einem zirkulär im Genom vorliegenden Vektor in der Southern Blot Analyse eine Bande mit einer spezifischen, dem eingesetzten Plasmid entsprechenden Größe (s. Abb. 2.3). Somit konnte in zwei der untersuchten Klone der zirkulär vorliegende Vektor nachgewiesen werden.

Für die definierte Integration wurden die Vektoren pEpi-L1CGΔpA1L und pGFP-C1Δ linearisiert und in CHO-K1-Zellen elektroporiert. Die nach G418-Selektion entstandenen Einzelklone wurden mittels Southern Blot Analyse auf die Anzahl der integrierten Kopien überprüft (s. Abb. 2.3). Daraufhin wurden für die weiteren Analysen zwei Klone mit dem integrierten Vektor pEpi-L1CGΔpA1L verwendet, wobei ein Klon mit einer Einzelkopie (IG9) und ein weiterer mit vier Kopien (IG13) integriert ist. Analog dazu wurde für das integrierte Kontrollkonstrukt pGFP-C1Δ verfahren. Dabei wurde ebenfalls ein Klon mit einer Einzelkopie (KG3) und ein Klon mit drei integrierten Kopien (KG4) verwendet.

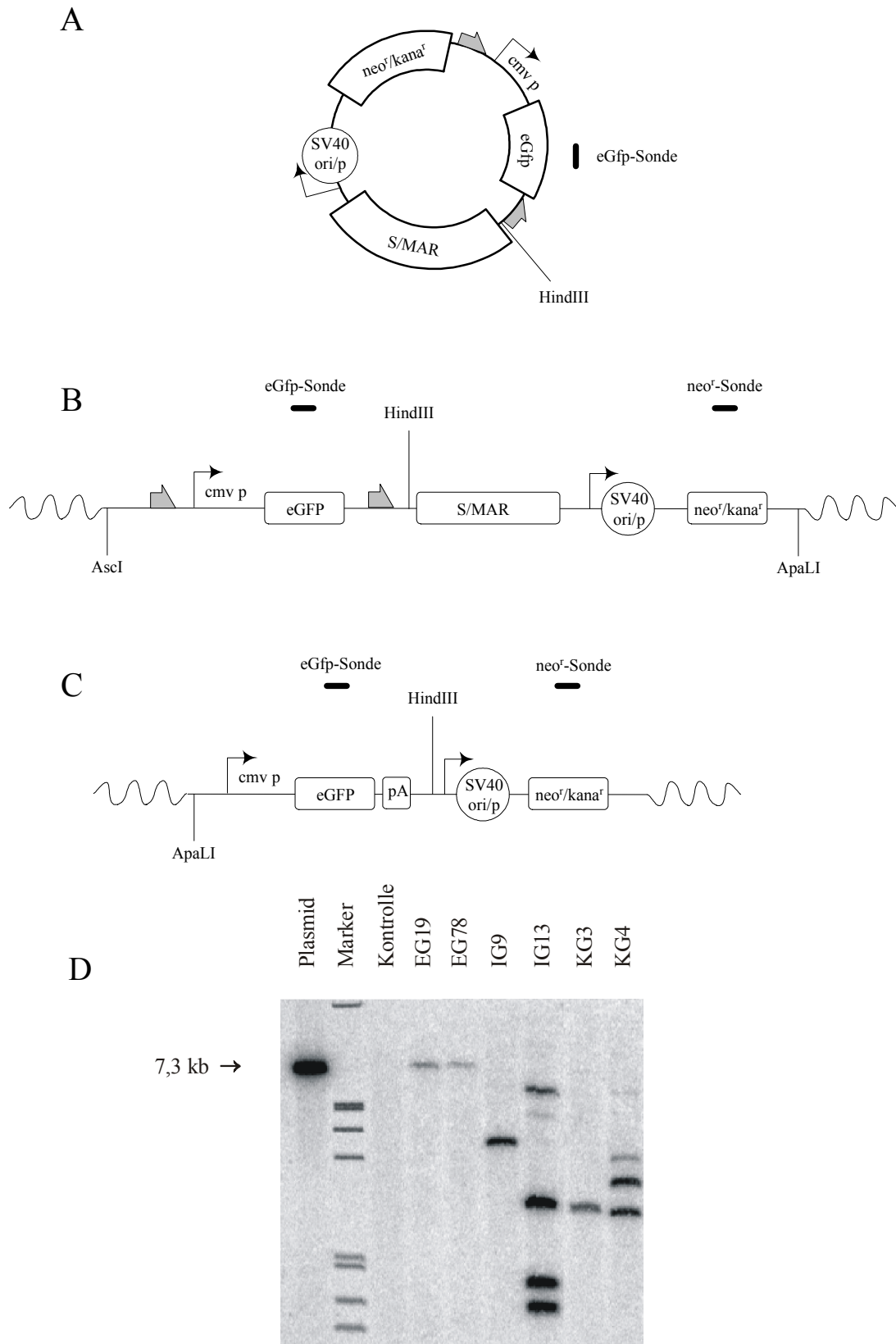


Abb. 2.3: Nachweis des episomalen Zustands des Vektors *pEpi-L1CGΔpA1L*, sowie zur Überprüfung der Kopienzahl der Kontrollvektoren mit und ohne S/MAR-Element im stabil im Genom integrierten Zustand.

A: Schematische Darstellung des zirkulären Vektors pEpi-L1CGΔpAIL. Die genomische DNA der zu analysierenden Klone wurde mit HindIII geschnitten und mit einem Fragment aus dem eGFP-Gen hybridisiert (schwarzer Balken).

B: Das Konstrukt pEpi-L1CGΔpAIL wurde mit den Restriktionsenzymen AscI und ApaLI linearisiert und stabil in CHO-K1-Zellen integriert. Ein anschließender Verdau mit HindIII und die Hybridisierung mit einer eGFP-Sonde ergibt somit Fragmente, die, abhängig von der nächstgelegenen HindIII-Schnittstelle im Genom, eine Größe von mindestens 2,1 kb bei einer vollständigen Integration aufweisen sollten.

C: Die Darstellung zeigt den durch das Enzym ApaLI linearisierten und in CHO-K1-Zellen integrierten Vektor pGFP-C1Δ. Nach dem Verdau der genomischen DNA mit HindIII sollte die Kopienzahl des integrierten Konstrukts über die Generierung von Fragmenten mit einer Größe von mindestens 1,6 kb nach Hybridisierung mit einer eGFP-Sonde nachgewiesen werden.

D: Southern Blot Analyse der episomal replizierenden Einzelklone EG19 und EG78 (**E**pisomal, **G**FP), für die nach der Hybridisierung mit einer eGFP-Sonde eine Bande mit einer Größe von 7,3 kb generiert werden konnte. Ebenfalls dargestellt sind die Einzelklone, die den Vektor pEpi-L1CGΔpAIL mit einer Einzelkopie (IG9, **I**ntegriert, **G**FP) bzw. mit vier (IG13) integrierten Kopien enthalten und die Kontrollklone, die nach Elektroporation des Vektors pGFP-C1Δ diesen in einer Einzelkopie (KG3, **K**ontrolle, **G**FP) bzw. drei Kopien (KG4) stabil ins Genom aufgenommen haben. Auf die Darstellung der Hybridisierung der vorliegenden Proben mit einer Sonde, die gegen den Bereich des neo^r-Gens gerichtet ist, wurde hier verzichtet. Kontrolle: nicht transfizierte CHO-K1-Zellen. Marker: λ HindIII/EcoRI, S³⁵ markiert.

2.1.1. Langzeitexpression und Stabilität der episomal replizierenden Vektoren im Vergleich zu stabil im Genom integrierten Kontrollen

Da in früheren Arbeiten ausschließlich die Stabilität des episomal replizierenden Vektors, nicht aber dessen Expressionseigenschaften untersucht wurden (Piechaczek et al, 1999 und Baiker et al., 2000), sollte hier zunächst die eGFP-Expression über einen längeren Kultivierungszeitraum hinweg bestimmt werden. Hierfür wurden in regelmäßigen Abständen FACS Analysen der Einzelklone, die den Vektor pEpi-L1CGΔpAIL episomal replizieren und der Einzelklone, die diesen bzw. den Vektor ohne das S/MAR-Element stabil ins Genom integriert enthalten, durchgeführt.

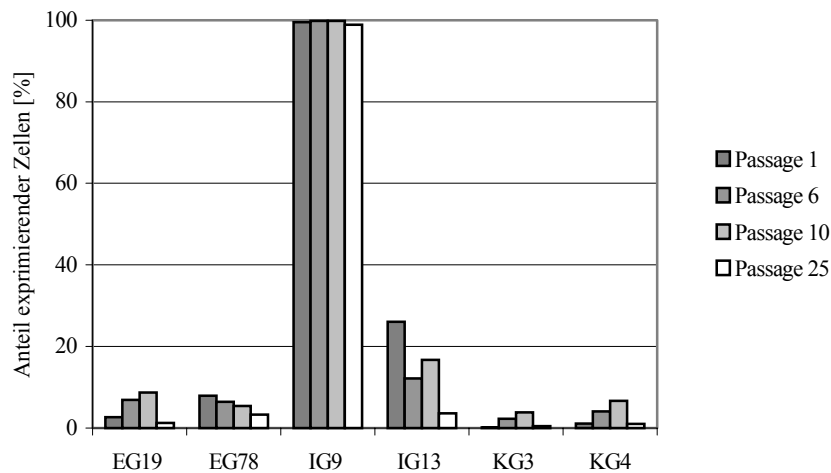


Abb. 2.4: Langzeitstabilität der Expression episomal replizierender Vektoren im Vergleich zu im Genom integrierten Vektoren.

Dargestellt ist der prozentuale Anteil eGFP-exprimierender Zellen nach Kultivierung der episomal replizierenden Einzelklone und der Kontrollklone, die die Vektoren pEpi-L1CG Δ pA1L bzw. pGFP-C1) in unterschiedlicher Kopienzahl stabil ins Genom integriert enthalten, über einen Zeitraum von 25 Passagen unter Selektionsdruck mit G418.

Dabei zeigte sich für die Klone EG19 und EG78, die den Vektor episomal replizieren, ein unterschiedliches Expressionsverhalten. Der Klon EG19 wies zu Beginn der Messungen einen sehr geringen Anteil exprimierender Zellen auf, der mit zunehmender Passagenzahl auf etwa 7-8 % anstieg, um schließlich wieder auf einen gerade noch detektierbaren Wert von 1,23 % abzufallen. Bei Klon EG78 lag der Anteil exprimierender Zellen zu Beginn bei etwa 8 %. Dieser verringerte sich bereits nach kurzer Kultivierungszeit auf 3-6 % und blieb dann stabil. Der Klon IG9, mit einer einzigen stabil ins Genom integrierten Kopie des Vektors pEpi-L1CG Δ pA1L, exprimierte in über 99 % der Zellen über den gesamten Messzeitraum eGFP. Der Klon mit vier integrierten Kopien des Vektors wies zunächst einen Anteil von 26 % exprimierender Zellen auf, der sich im Lauf der Zeit auf 3,66 % verringerte. Die beiden Klone, die das Kontrollkonstrukt pGFP-C1) stabil integriert enthalten, besaßen einen vergleichbar geringen Anteil exprimierender Zellen von maximal 6,7 %, der sich zum Ende des Messzeitraums schließlich auf weniger als 1 % einstellt. Dabei liegt der Anteil der exprimierenden Zellen im Einzelkopieklon stets unter dem im Klon mit drei integrierten Kopien des Vektors.

In einem weiteren Versuch wurde das Expressionsverhalten nach Wegnahme des Selektionsdrucks überprüft, da gezeigt wurde, dass dieser zwar für die Etablierung eines episomalen Zustands aber nicht für dessen Langzeitstabilität notwendig ist (Piechaczek et

al., 1999). Dazu wurden die Zellen der Klone EG19, IG9, IG13, KG3 und KG4 ab Passage 4 in G418-freiem Medium und parallel zu den Klonen unter G418-Selektion kultiviert. Der Anteil eGFP-exprimierender Zellen wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Klon EG19 zeigte einen sofortigen Rückgang des Anteils exprimierender Zellen auf 2-4 % und schließlich auf 0,8 %. Der Klon IG9 mit einer stabil integrierten Einzelkopie des pEpi-L1CG Δ pA1L zeigte über den gesamten Messzeitraum auch ohne Selektionsdruck eine Expression in nahezu 100 % der Zellen. Klon IG13 zeigte vergleichbare leichte Schwankungen unabhängig vom Selektionsdruck, wobei der Anteil exprimierender Zellen ohne Selektionsdruck stets etwa 2-4 % unter dem Anteil der Zellen, die mit G418 gehalten wurden, lag. Sobald der Selektionsdruck bei den Kontrollklonen entfernt wurde, ging der Anteil exprimierender Zellen hier auf weniger als 1 % zurück.

Der Anteil exprimierender Zellen in einem Klon, in dem der Vektor pEpi-L1CG Δ pA1L episomal repliziert, war im Vergleich zu Klonen, die diesen Vektor stabil integriert enthielten sehr gering. Die Abhängigkeit vom Selektionsdruck zur Aufrechterhaltung der Expression, nicht aber des episomalen Status in der Zelle konnte für Klon EG19 gezeigt werden. Hingegen war bei einem stabil integrierten Vektor, der ein S/MAR-Element enthält, der Anteil exprimierender Zellen nahezu unabhängig vom Selektionsdruck. Ohne dieses S/MAR-Element kam es bei Wegnahme des Selektionsdrucks zu einem Rückgang des Anteils exprimierender Zellen, wie in den Klonen KG3 und KG4 gezeigt werden konnte. Demnach bewirkte das S/MAR-Element im stabil ins Genom integrierten Zustand die Aufrechterhaltung der Expression des eGFP-Gens unabhängig von der integrierten Kopienzahl des Vektors. Das S/MAR-Element konnte jedoch nicht die Stabilität der Expression des episomal replizierenden Vektors im Klon EG19 gewährleisten. Da hier nur ein episomaler Klon untersucht werden konnte, wird die Abhängigkeit der Expression episomal replizierender Vektoren vom Selektionsdruck in den folgenden Kapiteln weiterführend an unterschiedlichsten Versuchsansätzen untersucht.

2.2. Einfluss der Transkriptionsrichtung auf die Funktion des Replikationsursprungs und somit auf die Stabilität des episomalen Status

Die Stabilität des episomalen Status hängt laut bisheriger Untersuchungen im Wesentlichen vom Replikationsursprung und dessen Zusammenspiel mit der auf dem Vektor befindlichen S/MAR-Sequenz ab. Die am besten charakterisierten genomischen Replikationsursprünge können sich entweder *upstream* (McWhinney et al., 1990) oder *downstream* (Dijkwel et al., 1995) der angrenzenden Transkriptionseinheit befinden. Aufgrund von topologischen Begebenheiten während des Transkriptionsprozesses würde die Lage eines Gens *downstream* des Replikationsursprungs zur Einzelstrangbildung führen und seine Funktion unterstützen. Zudem sind S/MAR-Sequenzen häufig in der Nähe von Replikationsinitiationsstellen lokalisiert, wodurch ihnen eine Rolle in der DNA-Replikation zugeschrieben werden kann (Übersicht in Brylawski et al., 2000). Im Folgenden wurde daher untersucht, inwiefern die Transkriptionsrichtung eines Gens die Funktion eines Replikationsursprungs beeinflusst.

2.2.1. Die Transkription über das Transgen hinaus ist notwendig für die Aufrechterhaltung des episomalen Status eines Vektors

Der Zusammenhang zwischen aktiver Transkription des auf dem episomalen Vektor befindlichen Transgens und der Aufrechterhaltung des episomalen Status wurde zunächst auf RNA-Ebene überprüft. Für die Isolierung der gesamten mRNA und die Durchführung der Northern Blot Analyse wurde ein Klon verwendet, der den Vektor pEpi-L1CGΔpA1L (s. Abb. 2.1) stabil episomal repliziert.

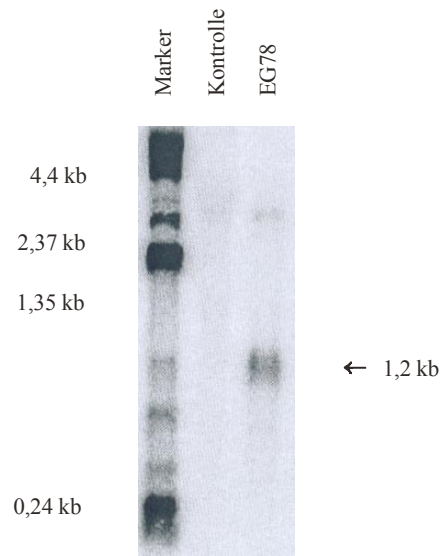


Abb. 2.5: Northern Blot Analyse zur Überprüfung der Termination der Transkription im episomal replizierenden Vektor pEpi-L1CGΔpA1L.

Die Gesamt-RNA des Klons EG78 und von nicht transfizierten CHO-K1-Zellen wurde isoliert und mit einer DNA-Sonde aus dem Bereich des eGFP-Gens hybridisiert.

Nach Hybridisierung der mRNA mit einer eGFP-Sonde konnte für den Klon EG78 eine Bande mit einer Größe von etwa 1,2 kb detektiert werden (s. Abb. 2.5). Das eGFP-Gen besitzt jedoch eine Größe von etwa 750 bp, was bedeutet, dass hier eine teilweise Transkription des S/MAR-Elements stattgefunden hat. Da die Transkription des eGFP-Gens im Vektor pEpi-L1CGΔpA1L nicht von einer 3' Polyadenylierungssequenz terminiert wird, wurde davon ausgegangen, dass die Transkription an einer bisher unbekannten Stelle im AT-reichen S/MAR-Element beendet wird. Eine Sequenzanalyse des S/MAR-Elements ergab Polyadenylierungsmotive nach etwa 450 bis 550 bp, an denen die Transkription des Gens letztlich gestoppt wurde. Eine unabhängige Hybridisierung mit einer Sonde aus dem *neo^r*-Gen diente als Positivkontrolle und lieferte ein Signal bei etwa 1,25 kb, was der Größe des transkribierten Selektionsmarkergens entspricht (Daten nicht gezeigt). Demnach scheint nicht nur die aktive Transkription selbst, sondern auch die transkriptionsbedingte Öffnung des S/MAR-Elements eine Voraussetzung für die Aufrechterhaltung des episomalen Status eines Vektors in der Zelle zu sein.

2.2.2. Cre-Rekombinase vermittelte Inversion der Transkriptionseinheit eines episomal replizierenden Vektors

Um den Einfluss der Transkriptionsrichtung eines auf einem episomal replizierenden Vektor befindlichen Gens auf die Funktion des Replikationsursprungs zu untersuchen, wurde die mit entgegengesetzt orientierten loxP-Sites flankierte Transkriptionseinheit des im Klon EG78 episomal vorliegenden Vektors pEpi-L1CGΔpA1L mittels Cre-Rekombinase invertiert (s. Kapitel 1.5.1). Bei diesem Vorgang entsteht theoretisch ein 1:1 Gemisch beider möglicher Orientierungen der Transkriptionseinheit (s. Abb. 2.6). An diesem System lassen sich differentielle Eigenschaften beider Orientierungsisomere parallel untersuchen und gegebenenfalls die Überlegenheit einer der beiden Orientierungen für episomale Funktionen ermitteln.

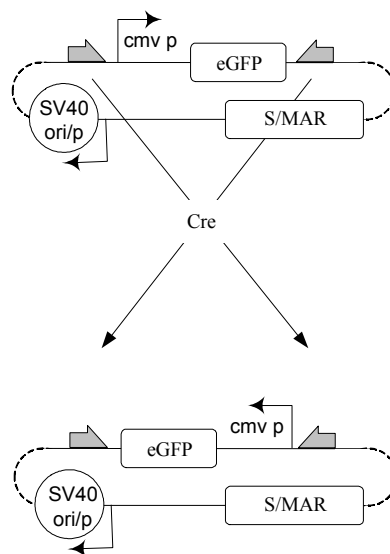


Abb. 2.6: Schematische Darstellung der Inversionsreaktion.

Die Transkriptionseinheit des Vektors pEpi-L1CGΔpA1L wird von zwei entgegengesetzt orientierten loxP-Sites flankiert. Die Inversionsreaktion der dazwischen liegenden Sequenz wird durch die Cre-Rekombinase katalysiert. Durch die Verwendung spezifisch bindender Primer kann in der PCR Analyse zwischen den beiden vorliegenden Orientierungen der Transkriptionseinheit unterschieden werden.

Hierfür wurden die Zellen des Klons EG78 mit dem Rekombinaseplasmid pCrePac elektroporiert und nach zweitägiger Puromycinselektion auf das Rekombinaseplasmid bis zur Klonbildung in G418-haltigem Medium kultiviert. Es wurden 15 Klone isoliert und hinsichtlich der Orientierung ihrer Transkriptionseinheit mittels PCR-Analyse untersucht.

Für die Untersuchung der Subklone bezüglich der Orientierung ihrer Expressionskassette wurde ein Primersystem verwendet, welches aus den drei verschiedenen Oligomeren *sarrev/cmyfwd/cmvrev* besteht (s. Abb. 2.7). Durch die simultane Verwendung dieser Primer konnten die zwei resultierenden Orientierungsisomere der Transkriptionskassette in einer einzigen PCR-Reaktion dargestellt werden. Dadurch war es möglich, das Auftreten beider Orientierungsisomere innerhalb eines Subklons simultan nachzuweisen. Die Verteilung der Orientierungen der Transkriptionseinheit in den Subklonen des EG78 ist in Abbildung 2.7 dargestellt.

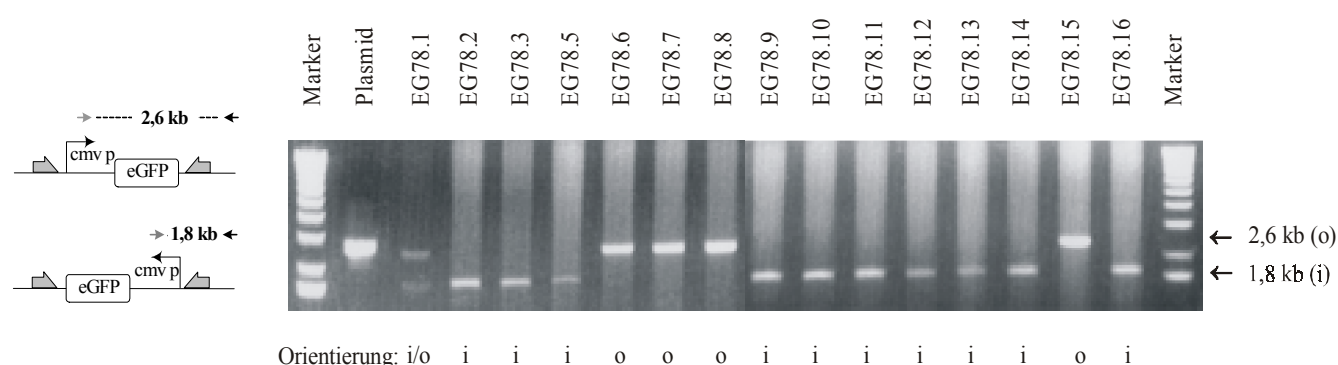


Abb. 2.7: PCR Analysen zur Überprüfung der vorliegenden Orientierungen der Transkriptionseinheit in den Subklonen des EG78.

Die genomische DNA der Subklone des episomal replizierenden Einzelklons EG78 wurde unter Verwendung der Primer *cmyfwd/cmvrev* (graue Pfeile)/*sarrev* (schwarze Pfeile) für die PCR-Reaktion eingesetzt. Die Bande mit einer Größe von 2,6 kb entsteht für die Subklone, die die Transkriptionseinheit in der ursprünglichen Orientierung (o=original) enthalten. In den Subklonen, in denen eine Inversion (i=invertiert) der Transkriptionseinheit stattgefunden hat, wurde eine 1,8 kb-große Bande amplifiziert. Marker: 1 kb-Leiter.

	invers	original	beide Orientierungen
Subklonanzahl	10	4	1
Prozentualer Anteil	66,67 %	26,67 %	6,67 %

Tab. 2.1: Effizienz der Inversionsreaktion.

Inversionsrate in den Subklonen des Einzelklons EG78 nach Ermittlung der Orientierung der Transkriptionseinheit in der PCR.

Die transiente Rekombinaseexpression hat in 66,67 % der Subklone zu einer Inversion der Transkriptionseinheit geführt (s. Tab. 2.1). In 26,67 % der Klone war die Rekombinase entweder nicht funktionell oder es hat eine Rückreaktion zur ursprünglichen Orientierung stattgefunden. Ein Subklon enthält ein Gemisch aus beiden Orientierungsisomeren. Diese

Erkenntnisse sprechen für eine hohe Effizienz der Cre-Rekombinase in diesem System. Die Etablierung von Klonen mit invertierter Transkriptionseinheit ermöglichte gleichzeitig die Eingrenzung der Anzahl episomal vorliegender Vektoren im Ausgangsklon EG78. Durch die Inversionsreaktion wird ein Gemisch beider möglicher Orientierungen der Transkriptionseinheit erwartet. Dies konnte jedoch nur für einen der Subklone gezeigt werden. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass im Parentalklon eine sehr geringe Kopienzahl des Vektors von nur ein bis zwei Kopien vorlag.

2.2.2.1. Die Inversion der Transkriptionseinheit führt zum Verlust des episomal replizierenden Vektors in der Zelle

Nach der Feststellung der vorliegenden Orientierung der Transkriptionseinheit in den Subklonen des EG78 wurden die fünfzehn Subklone auf die Stabilität des episomalen Status des Vektors in der Zelle untersucht. Hierfür wurde die Gesamt-DNA mit dem Restriktionsenzym HindIII geschnitten und anschließend über eine Southern Blot-Analyse mit einer Sonde aus dem Bereich des SV40-Promotors hybridisiert.

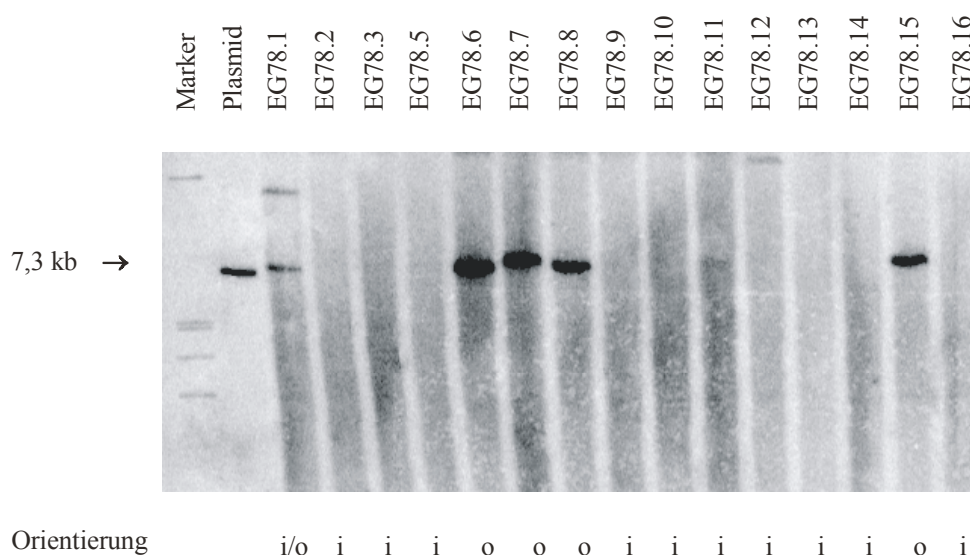


Abb. 2.8: Nachweis der Episomalität des Vektors in den Subklonen des EG78.

Southern Blot Analyse der Subklone des EG78. Die genomische DNA wurde mit dem Enzym HindIII geschnitten und anschließend mit einer DNA-Sonde aus dem Bereich des SV40-Promotors hybridisiert. Die entstandene Bande bei 7,3 kb entspricht dabei der Gesamtgröße des episomal replizierenden Vektors pEpi-L1CGΔpA1L. Marker: λ HindIII/EcoRI, S³⁵ markiert.

Die Southern Blot Analyse ergab, dass in den Subklonen EG78.6, EG78.7, EG78.8 und EG78.15 (s. Abb. 2.8), die laut PCR-Analyse die ursprüngliche Orientierung aufwiesen (s.

Abb. 2.7) weiterhin der Vektor pEpi-L1CG Δ pA1L episomal vorlag. Bei Klon EG78.1, der laut PCR-Analyse den Vektor in beiden Orientierungen der Transkriptionseinheit besaß, konnte sowohl der episomale Zustand als auch eine zusätzliche Integration detektiert werden. Hingegen wies keiner der Subklone, in denen die Transkriptionseinheit invertiert vorlag, einen episomal replizierenden Vektor auf. Zudem wurden keine Hinweise auf eine Integration des Vektors oder Vektoranteile in der Southern Blot Analyse gefunden (s. Abb. 2.8), obwohl diese Klone nach wie vor eine Resistenz gegenüber G418 aufwiesen. Daher wurden sie mittels PCR auf das Vorhandensein von Vektorbestandteilen überprüft. Dazu wurden verschiedene Primerpaare verwendet, die jeweils einen bestimmten Abschnitt des Vektors, wie zum Beispiel den Bereich des *neo'*-Gens, amplifizierten. Durch diese Analysen konnte nachgewiesen werden, dass in den Klonen mit invertierter Transkriptionskassette noch ein Großteil des Vektors, darunter das *neo'*-Gen, der Bereich des S/MAR-Elements und des *cmv*-Promotors, vorhanden war (Daten nicht gezeigt). Allerdings schien ein spezifischer Bruch im Bereich des eGfp-Gens und der 3' davon befindlichen loxP-Erkennungsstelle stattgefunden zu haben, da dieser Bereich nur in einem der Klone amplifiziert werden konnte. Dadurch kam es zu einer Integration des Vektors ins zelluläre Genom. Dies bestätigte frühere Ansätze, in denen ein Vektor, der die Transkriptionskassette ohne die Polyadenylierungsstelle bereits in einer inversen Orientierung enthält (pIA-I, s. Kapitel 4.13), nach der Elektroporation in CHO-K1-Zellen stets in das Genom integrierte. Die Inversion der Transkriptionseinheit führte somit immer zur Aufhebung des episomalen Zustands des Vektors in der Zelle.

2.2.2.2. Expressionsverhalten der Subklone in Bezug auf ihren episomalen Status

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich die verschiedenen generierten Subklone des EG78, die auch nach der Inversionsreaktion die ursprüngliche Orientierung der Transkriptionseinheit besaßen, in ihrem Expressionsverhalten voneinander unterscheiden. Hierzu wurde die eGFP-Expression der einzelnen Subklone und des Parentalklons durch eine FACS Analyse bestimmt (s. Abb. 2.9).

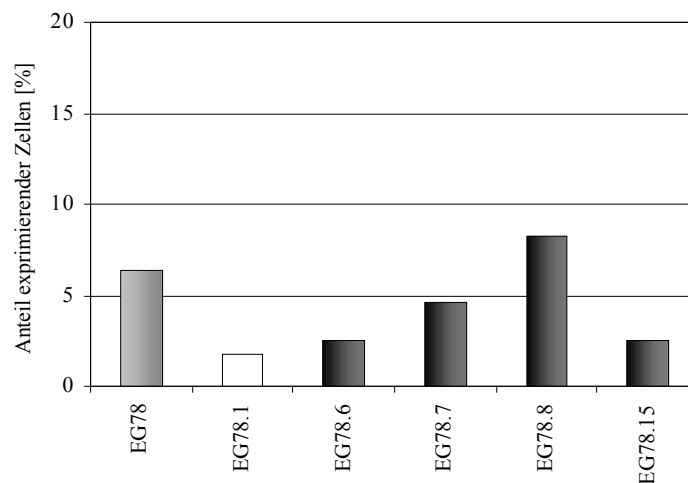


Abb. 2.9: Expressionshöhe der Subklone nach der Inversionsreaktion.

Der prozentuale Anteil eGFP-exprimierender Zellen wurde sowohl für den Parentalklon EG78 (grauer Balken), als auch für die Subklone mit ursprünglicher (schwarze Balken) Orientierung der Transkriptionseinheit gezeigt. Der Klon, der beide Orientierungen enthält, ist als gestreifter Balken dargestellt.

Der Parentalklon EG78 (grauer Balken) enthielt bereits vor der Inversion einen Anteil eGFP-exprimierender Zellen von nur 6,42 %. Die Subklone, welche die Transkriptionseinheit in derselben Orientierung vorliegen haben wie der Parentalklon (schwarze Balken), besitzen daher einen ähnlichen Anteil exprimierender Zellen, der zwischen 2,49 und 8,27 % liegt. Diese Subklone wurden für einen längeren Zeitraum kultiviert. Dabei stellten sich deutliche Unterschiede zwischen den eigentlich genomisch identischen Subklonen bezüglich ihrer Stabilitätseigenschaften heraus (s. Abb. 2.10).

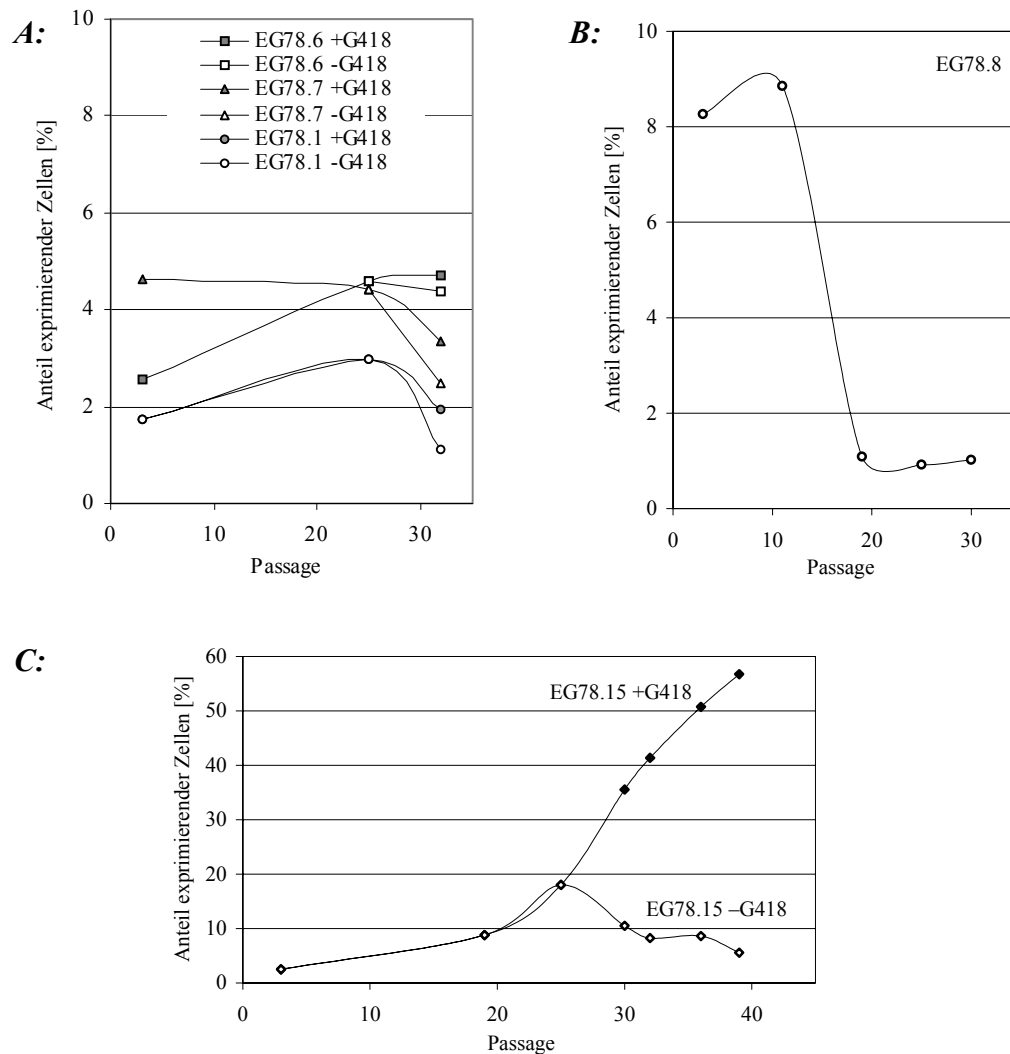


Abb. 2.10: Expressionsverhalten der Subklone des EG78 bei Langzeitkultivierung.

Abhängig vom Selektionsdruck wurde in regelmäßigen Abständen der Anteil eGFP-exprimierender Zellen durch eine FACS Analyse bestimmt.

A: Die Subklone EG78.1, EG78.6 und EG78.7 wurden mit G418 über 32 Passagen kultiviert. Nach 23 Passagen wurden die Zellen parallel ohne Selektionsdruck über weitere 9 Passagen gehalten.

B: Der Subklon EG78.8 wurde für einen Zeitraum von 30 Passagen mit G418 kultiviert und zeigte einen Expressionsabfall zwischen Passage 11 und 19.

C: Der Anteil exprimierender Zellen des Subklons EG78.15 erhöhte sich bei der Kultivierung mit G418, wohingegen die Wegnahme des Selektionsdrucks nach 23 Passagen zu einem gleich bleibenden Anteil exprimierender Zellen führte.

Die Klone EG78.1, EG78.6 und EG78.7 zeigten während des Zeitraums der Messungen über 36 Passagen stets einen gleich bleibenden, wenn auch geringen Anteil exprimierender Zellen von etwa 3-4 % (s. Abb. 2.10, A). Nach 23 Passagen unter Selektionsdruck G418 wurde dieser entfernt und die Zellen für weitere 13 Passagen ohne Selektionsdruck parallel

passagiert. Sowohl die Expression als auch der episomale Zustand in diesen Klonen blieb dabei über den gesamten Zeitraum stabil, was mittels FACS bzw. Southern Blot Analyse (Daten nicht gezeigt) überprüft wurde.

Im Klon EG78.8 (s. Abb. 2.10, B) konnte zwischen Passage 11 und 19 ein deutlicher Abfall im Anteil exprimierender Zellen festgestellt werden. Die Southern Blot Analyse dieses Klons nach Passage 16 machte deutlich, dass der episomal replizierende Vektor verloren gegangen war. Der Versuch der Amplifikation von spezifischen Abschnitten des Vektors in der PCR zeigte für diesen Klon den Verlust des eGFP-Gens, wobei Teile des Vektorrückgrats, unter anderem auch die *neo^r*-Kassette, noch detektierbar waren (Daten nicht gezeigt). Dies deutete darauf hin, dass in diesem Klon ein Verlust des episomalen Zustands durch Integration ins Genom nach etwa 16 Passagen Kultivierung stattgefunden hat.

Für Klon EG78.15 hingegen konnte mit steigender Passagenzahl auch eine Erhöhung des Anteils exprimierender Zellen von 2,49 % auf 56,75 % erreicht werden (s. Abb. 2.10, C). Die Kultivierung ohne G418 lieferte eine stabile Expression in etwa 3 bis 8 % der Zellen über den gesamten Messzeitraum.

Ob in diesem Klon epigenetische Aktivierungsprozesse in Form von Histon-Hyperacetylierung eine Erhöhung des Anteils exprimierender Zellen zur Folge hatten, sollte durch den Einfluss des Histon-Deacetylase-Inhibitors Butyrat überprüft werden. Nach Zugabe von 5 mM Butyrat über einen Zeitraum von 72 Stunden wurde die eGFP-Expression des Klons EG78.15, der mit bzw. ohne Selektionsdruck passagiert wurde, im Vergleich zu nicht mit Butyrat behandelten Zellen durch eine FACS Analyse ermittelt.

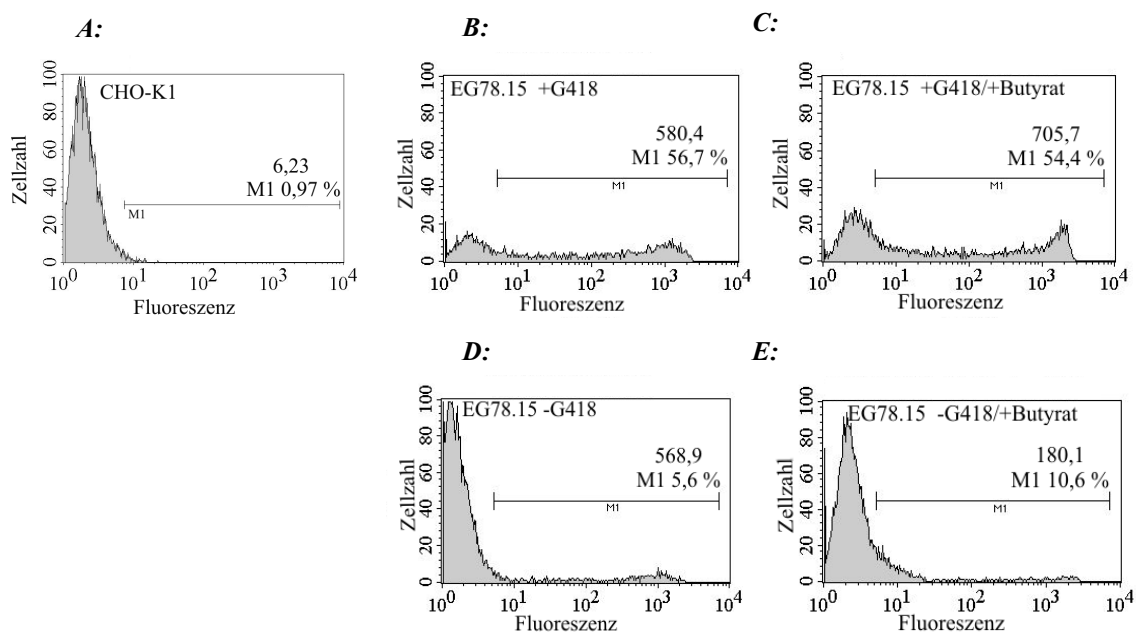


Abb. 2.11: Untersuchung der Butyratwirkung auf die Expression des Subklons EG78.15.

Dargestellt sind die FACS Analysen zur Bestimmung des Anteils eGFP-exprimierender Zellen im Klon EG78.15 mit (+) bzw. ohne (-) Selektionsdruck vor und nach Inkubation mit Butyrat für 72 Stunden bei Passagenzahl 39. A: CHO-K1-wt, B: EG78.1 +G418, C: EG78.1 +G418/+Butyrat, D: EG78.1 -G418, E: EG78.1 -G418/+Butyrat

Der Anteil an Zellen, der über den gesamten Zeitraum unter G418 gehalten wurde zeigte nach Inkubation mit Butyrat eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität um einen Wert von 18 %, jedoch keine Erhöhung des Anteils exprimierender Zellen (s. Abb. 2.11, B und C). Die Zellen, die nach Passage 23 keinem Selektionsdruck ausgesetzt waren und deren Anteil exprimierender Zellen nach weiteren 16 Passagen auf 5,6 % abgesunken war, zeigten nach Butyratinkubation eine Verdopplung des Anteils exprimierender Zellen. Die Expression dieser Zellen zeigte allerdings eine relativ geringe Fluoreszenzintensität (s. Abb. 2.11, D und E). Diese Reaktivierung der Expression in einigen Zellen, deutete hiermit auf einen Verlust der Expression aufgrund einer Inaktivierung durch epigenetische Mechanismen hin. Demnach war in diesem Subklon der Rückgang des Anteils exprimierender Zellen auf die Inaktivierung durch Histon-Deacetylierung zurückzuführen.

2.2.2.3. Die Expression ist abhängig von der Transkriptionsrichtung

Die Orientierung der Transkriptionseinheit spielt nach den bisherigen Erkenntnissen eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung des episomalen Status eines Vektors in der Zelle. Bisher wurden dazu Subklone analysiert, die entweder die ursprüngliche oder die invers orientierte Transkriptionseinheit besitzen. Im Folgenden sollte zur weiteren Verifizierung der Subklon EG78.1, in dem beide Orientierungen simultan vorliegen, daraufhin untersucht werden, ob eine der beiden Orientierungen spezifisch in der Population der exprimierenden bzw. nicht-exprimierenden Zellen aufzufinden ist. Für diesen Klon wurde eine FACS-Sortierung vorgenommen (Daten nicht gezeigt), bei der die Subpopulation der exprimierenden Zellen von der nicht-exprimierenden getrennt wurde. Diese beiden Subpopulationen wurden parallel mit G418 kultiviert und nach der DNA-Isolierung auf die vorliegende Orientierung ihrer Transkriptionseinheit mittels PCR (vgl. Kapitel 2.2.2) überprüft.

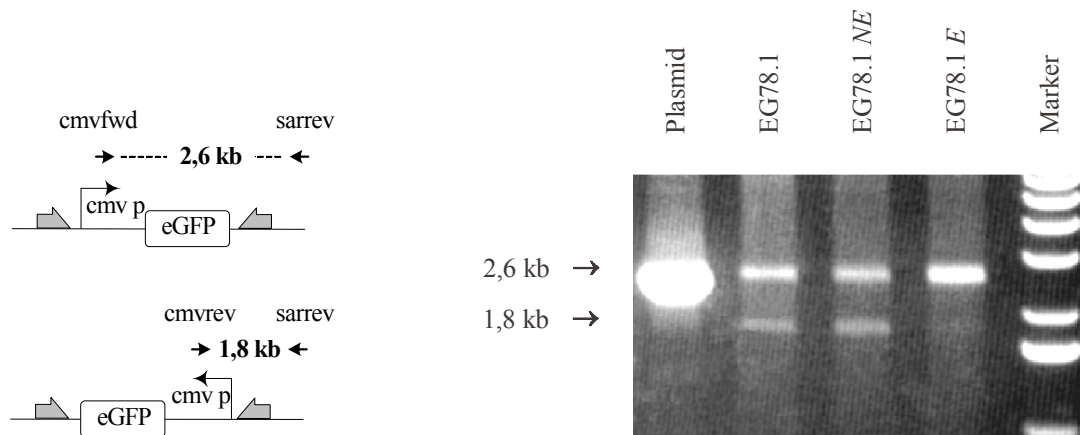


Abb. 2.12: PCR Analyse zur Überprüfung der vorliegenden Orientierungen der Transkriptionseinheit in den verschiedenen Subpopulationen des Subklons EG78.1.

Die unterschiedliche Verteilung der in den Subpopulationen vorliegenden Orientierungen wurde unter Verwendung des Primersystems cmv fwd/cmv rev/sar rev in der PCR-Reaktion gezeigt. Marker: 1 kb-Leiter.

Dabei konnte für die nicht-exprimierende (NE) Subpopulation des Klons EG78.1 die gleiche Verteilung der beiden Orientierungen der Transkriptionseinheit festgestellt werden wie für die Gesamtpopulation des Klons EG78.1. Bei der exprimierenden (E) Subpopulation hingegen ist die Bande bei 2,6 kb deutlich stärker als die Bande bei 1,8 kb (s. Abb. 2.12). Das bedeutet, dass in dieser Subpopulation der Anteil an Zellen, die den Vektor in der ursprünglichen Orientierung enthalten gegenüber dem Anteil an Zellen, die den Vektor mit invertierter Transkriptionseinheit enthalten, erhöht ist.

Der episomale und der zusätzliche integrierte Zustand wurde laut Southern Blot Analyse sowohl in der exprimierenden als auch in der nicht-exprimierenden Population aufrechterhalten. Somit hat hier eine Anreicherung des episomal replizierenden Vektors in der Population der exprimierenden Zellen stattgefunden. Dies lieferte zusätzlich zu den bisherigen Daten (s. Kapitel 2.2.2.1) eine Bestätigung dafür, dass die Transkription in Richtung auf den Replikationsursprung für eine stabile Expression und Replikation des episomalen Vektors notwendig ist.

2.3. Exzision eines Minimalepisoms

Im Folgenden wurde die Flp-Rekombinase-vermittelte Exzision eines Minimalepisoms aus einem stabil ins Genom integrierten Konstrukt etabliert. Dieses System bietet diverse Möglichkeiten zur Verbesserung des bisher verwendeten episomalen Vektorsystems. Die Replikation des exzisierten Vektors beginnt mit einer definierten Kopienzahl pro Zelle. Dies ermöglicht quantitative Analysen hinsichtlich Expressions- und Stabilitätsanalysen. Zudem werden prokaryontische Anteile des Vektors, die aufgrund ihres hohen GC-Gehalts einen negativen Einfluss in Form von Methylierungs- und Inaktivierungsprozessen auslösen können, aus dem episomalen Vektor weitestgehend entfernt. Die Eliminierung erfolgt daher im Sinne einer verbesserten Funktion des Minimalepisoms.

Hierzu wurden zwei gleichgerichtete Flp-Rekombinase-Erkennungsstellen (*FRT-Sites*) in das Grundkonstrukt pEpi-eGFP eingebracht, die das eGFP-Gen, das S/MAR-Element und den SV40-Replikationsursprung flankieren (s. Abb. 2.13, schematische Darstellung des Vektors pEpi-FGSARF). Nach kurzzeitiger Expression der Flp-Rekombinase sollte durch intramolekulare Rekombination ein replizierendes Minimalepisom resultieren (s. Kapitel 1.5.2). Der prokaryontische Anteil des Vektors verbleibt dabei im Genom.

2.3.1. Generierung von CHO-K1-Klonen mit definierter Kopienzahl des stabil ins Genom integrierten Vektors und anschließende Exzision

Zur initialen Generierung von CHO-K1-Einzelklonen, die den Vektor pEpi-FGSARF stabil in das Genom integriert enthalten, wurde dieser mit den Restriktionsenzymen ApaI und BspI, die beide im Bereich des Vektorrückgrats schneiden (s. Abb. 2.13), linearisiert, in CHO-K1-Zellen elektroporiert und in G418-haltigem Medium selektiert. Es konnten 31 resistente Klone isoliert werden. Diese wurden für eine anschließende Analyse auf die vorliegende Kopienzahl und die Vollständigkeit des integrierten Konstrukts in den Zellen herangezogen, woraus ihre Eignung für eine Exzision abgeleitet wurde (Daten nicht gezeigt). In drei Klonen (F2, F13 und F17) konnte eine singuläre Integration des Vektors nachgewiesen werden. Mittels PCR unter Verwendung von Primern, die in den Randbereichen des integrierten Vektors binden (s. Abb. 2.13) konnte die Vollständigkeit der Integration nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Funktionalität des integrierten Transgens eGFP wurde an dieser Stelle mittels FACS Analyse bestimmt.

Dabei zeigte sich, dass jeder der drei Einzelklone eine Expression aufweist, die zwischen 26,94 % exprimierende Zellen im Klon F17, 27,94 % im Klon F2 und 61,41 % im Klon F13 lag. Die drei Einzelkopieklone mit jeweils vollständig integriertem Vektorfragment des pEpi-FGSARF wurden somit im Folgenden für die Exzision des Minimalepisoms herangezogen.

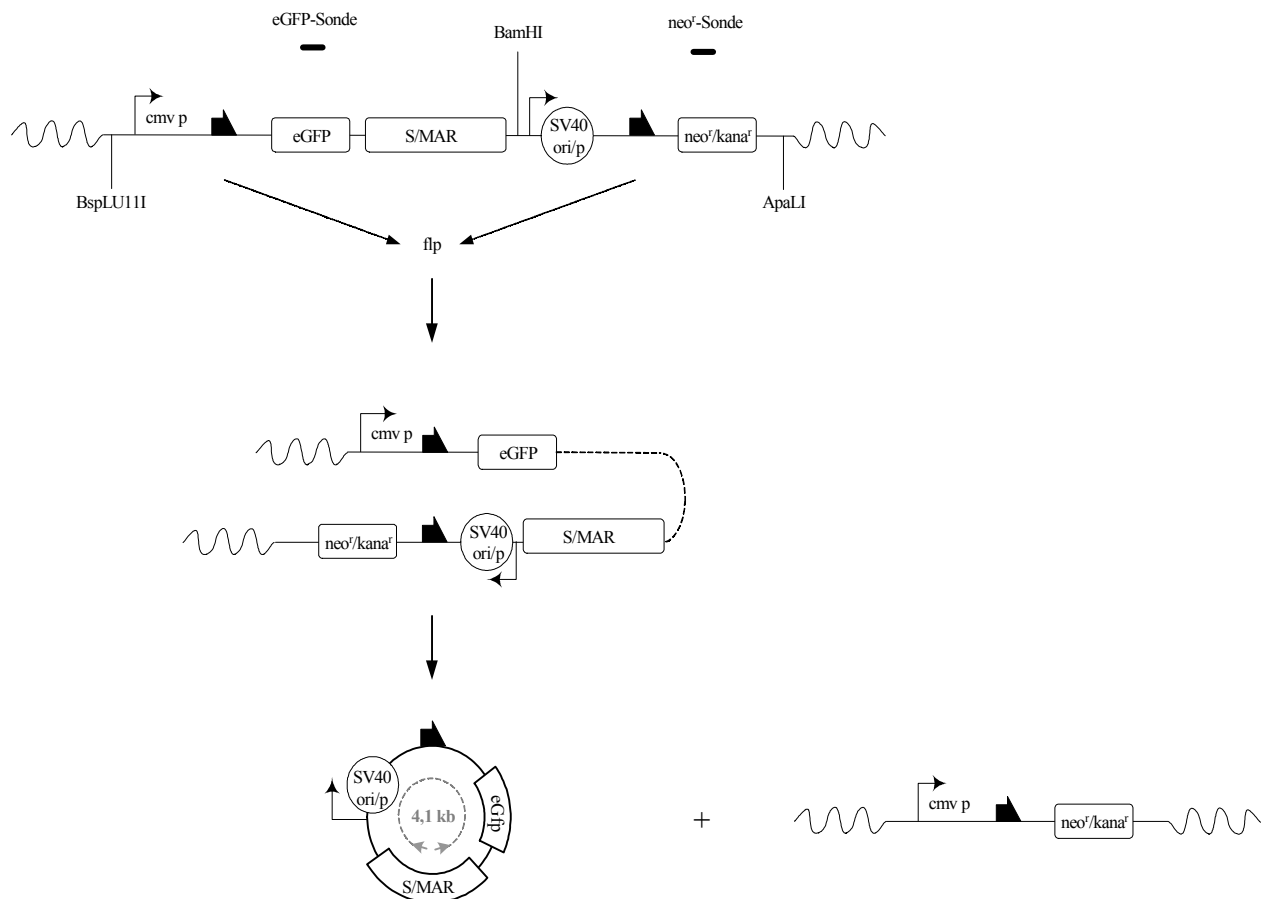


Abb. 2.13: Schematische Darstellung der Exzisionsreaktion zur Generierung eines Minimalepisoms aus einem stabil im Genom integrierten Vektor.

In der oberen Zeile ist der Vektor pEpi-FGSARF nach Linearisierung und Integration ins Genom schematisch abgebildet. Die durch schwarze Halbpfleile gekennzeichneten FRT-Sites flankieren das eGFP-Gen, das S/MAR-Element, sowie den SV40-Replikationsursprung/Promotor. Die Kopienzahl, mit dem der Vektor stabil ins Genom integriert ist, kann über eine Southern Blot Analyse nach Restriktion mit dem Enzym BamHI und einer anschließenden Hybridisierung mit zwei Sonden aus den Bereichen des eGFP- bzw. neo^r-Gens (schwarze Balken) bestimmt werden. In Anwesenheit einer aktiven FLP-Rekombinase erfolgt die Exzision des zwischen den FRT-Sites befindlichen Vektoranteils.

Das exzidierte Minimalepisom kann über eine Southern Blot Analyse nach BamHI-Restriktion und Hybridisierung mit einer geeigneten Sonde und durch eine PCR Analyse, bei der der gesamte Vektor amplifiziert wird, nachgewiesen werden.

2.3.1.1. Rekombinase-vermittelte Exzision eines Minimalepisoms in Einzelkopieklonen

Für die Exzision des von den FRT-sites flankierten Vektoranteils wurden die Einzelkopieklone, welche ein vollständiges Integrat des Vektors enthielten, in zwei unabhängigen Ansätzen mit einem Flp-Rekombinase kodierenden Plasmid transfiziert.

Im ersten Ansatz wurden dazu die Zellen der Einzelklone F2, F13 und F17 mit dem Vektor pFlpe (s. Kapitel 4.13) transfiziert. Es folgte eine transiente Selektion auf die Puromycin-resistenz des Rekombinaseplasmids pFlpe, wodurch eine transiente Expression der Flp-Rekombinase in den resistenten Zellen vorlag. Zusätzlich wurde die Selektion mit G418 aufrechterhalten, da nach einer erfolgten Exzision das im Genom verbleibende *neo^r*-Gen durch den Wegfall der dazwischen liegenden Sequenz fortan unter der Kontrolle des *cmv*-Promotors steht und somit auch in erfolgreich exzisierten Zellen immer noch eine G418-Resistenz vorliegt. Die somit entstandenen Subklongemische wurden mittels PCR auf ein erfolgtes Rekombinationsereignis untersucht (s. Abb. 2.14). Das dabei generierte 630 bp-Fragment entstand in diesen Subklongemischen als Folge der Rekombinationsreaktion, bei der der zwischen den FRT-Sites liegende Vektoranteil exzidiert wurde. Zudem konnte in diesen Subklongemischen zusätzlich der noch integrierte Zustand des gesamten Vektors nachgewiesen werden. Die Expression der Rekombinase hat somit nicht in allen Zellen des Subklongemisches zur Exzision geführt. Als Kontroll-DNA wurde für die vorliegenden PCR-Reaktionen stets Plasmid-DNA des Vektors pEpi-FGSARF verwendet. Abbildung 2.14 zeigt dabei, dass, ebenso wie für die Subklongemische, auch für die Plasmid-DNA eine 630 bp-große Bande generiert wurde. Dies deutete darauf hin, dass in der Plasmid-DNA ohne Flp-Rekombinase eine spezifische Exzision des zwischen den FRT-Sites befindlichen Vektoranteils stattgefunden haben muss.

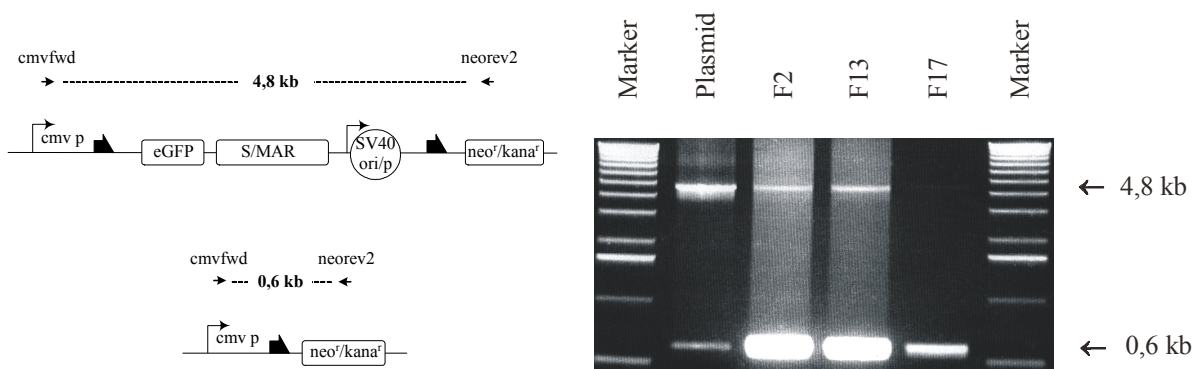


Abb. 2.14: Überprüfung auf Exzision durch PCR am verbleibenden Integrat.

Die nach der Exzisionsreaktion entstandenen Subklongemische der Klone F2, F13 und F17 wurden anhand der Primer *cmvfwf*/*neorev2* auf eine erfolgte Exzision des zwischen den FRT-Sites befindlichen Vektoranteils

überprüft, wobei ein 4,8 kb-großes Fragment entsteht. Eine erfolgte Exzisionsreaktion kann über eine PCR Analyse, bei der die selben Primer wie zur Vollständigkeitsanalyse verwendet werden können, nachgewiesen werden. Das dabei entstehende Fragment hat nach der Exzision eine Größe von 0,6 kb. Marker: 1 kb-Leiter.

In den vorliegenden Subklongemischen sollte anschließend das Vorhandensein des aus dem Genom exzisierten Anteils, also des Minimalepisoms, nachgewiesen werden. Auch dieser Nachweis sollte durch die Verwendung geeigneter Primer mittels PCR erbracht werden. Allerdings konnte hierfür auch nach Verwendung verschiedener Primerpaare der vollständige exzisierte Vektor nicht amplifiziert werden, was auf einen Verlust des exzisierten Anteils durch Degradation des Minimalepisoms hindeutete. Zudem bestand die Möglichkeit, dass der stets vorliegende Selektionsdruck einen negativen Einfluss auf die Stabilität des episomalen Zustands in diesem System hatte.

In einem weiteren Ansatz wurden die Zellen der Klone F2, F13 und F17 mit dem Vektor pFRFus transfiziert. Dieser Vektor enthält ein Fusionsgen aus dem „Rot-fluoreszierenden Protein“-Gen (RFP) aus dem Vektor pDSRed1-N1 (Clontech) und dem Flpe-Gen unter der Kontrolle des cmv-Promotor/Enhancers. Frühere Studien haben gezeigt, dass die Expression des RFP im Fusionsprotein nur etwa ein Zehntel der Expression im Ursprungsvektor beträgt (Baer, 2002). Nach zweitägiger Selektion auf das Rekombinaseplasmid wurde mittels FACS Analyse der Anteil an Zellen bestimmt, der sowohl das eGFP-Gen, welches sich im integrierten Vektor befindet, als auch das RFP-Gen, das durch die Transfektion eingebracht wurde, exprimiert. Beide Proteine werden dabei mit Licht der Wellenlänge 489 nm angeregt. Das eGFP emittiert daraufhin Strahlung im Bereich von 508 nm, wohingegen das RFP sein Emissionsmaximum bei 583 nm besitzt. Die Expression dieser beiden Proteine kann daher in der FACS Analyse gut voneinander unterschieden werden. Für jeden der drei verwendeten Parentalklone lag der Anteil an RFP-exprimierenden Zellen bei 3 bis 6 % (Daten nicht gezeigt). Die Zellen, die RFP und eGFP simultan exprimierten, wurden einzeln auf 96-Loch Platten ausgesät und ohne Selektionsdruck kultiviert. Nach Isolierung der Gesamt-DNA wurde der Anteil erfolgreich exzisierter Subklone mittels PCR (s. Abb. 2.14) bestimmt. Der prozentuale Anteil erfolgreicher Exzisionen in den Subklonen für jeden Parentalklon ist in Tabelle 2.2 dargestellt. Die Effizienz der Exzisionen in allen Subklonen beträgt demnach insgesamt 24 %. Da jeder der untersuchten Subklone zuvor das RFP exprimierte, aber nur in etwa jedem vierten die Rekombinase aktiv war, lieferte dies einen Hinweis auf die Effektivität des im Vektor pFRFus als Fusionsgen vorliegenden Flp-Rekombinase-Gens.

Parentalklon	Anzahl der Subklone	Prozentualer Anteil der Exzisionen
F2	32	28 %
F13	48	25 %
F17	37	19 %

Tab. 2.2: Effizienz der Exzisionsreaktion durch Sortierung von RFP-exprimierenden Zellen nach Transfektion mit pFRFus.

Die Tabelle zeigt den prozentualen Anteil der in den Subklonen stattgefundenen Exzisionen. Daraus ergibt sich eine durchschnittliche Gesamt-Exzisionsrate von 24 %.

Die erfolgreich exzisierten Subklone wurden anschließend auf das Vorhandensein des exzisierten Minimalepisoms untersucht. Weder durch eine PCR noch über die Southern Blot Analyse konnte der exzisierte Anteil des Vektors detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Eine vergleichende FACS-Analyse zwischen dem jeweiligen Parentalklon und den exzisierten Subklonen zeigte, dass keiner der Subklone eGfp exprimierte. Durch die umfangreichen Analysen konnte daher eine Integration des exzisierten Vektoranteils an eine andere Stelle im Genom ausgeschlossen werden. Somit hat in allen Subklonen eine Exzision mit anschließender Degradierung des exzisierten Vektoranteils stattgefunden.

Um den Einfluss der Kopienzahl eines in einer Zelle vorliegenden episomal replizierenden Vektors auf Expressionshöhe und Stabilität des episomalen Zustands zu untersuchen, sollte die Exzision des Episoms an Klonen durchgeführt werden, die mehr als eine Kopie des stabil ins Genom integrierten Vektors pEpi-FGSARF enthalten.

Dazu wurden die Zellen von drei verschiedenen Klonen mit jeweils mindestens dreifacher Kopie des integrierten Vektors mit der Flp-Rekombinase transfiziert. Nach einer transienten Puromycin- Selektion wurde die DNA der Zellen isoliert und mittels PCR hinsichtlich einer erfolgreichen Exzision überprüft. Allerdings konnte auch hier der exzisierte Vektoranteil nicht nachgewiesen werden.

Die Exzision eines definierten Vektoranteils aus einem in das Genom integrierten Konstrukt lieferte für keinen der analysierten Klone ein stabil replizierendes Minimalepisom. Dies könnte an dieser Stelle darin begründet sein, dass der exzisierte Vektoranteil in der resultierenden zirkulären Form nicht als episomaler Vektor funktionell ist. In dem hier vorgestellte Exzisionskonzept wurde gezielt auf eine Selektion auf den exzisierten Vektoranteil verzichtet. Da dies zu einer Degradation des Minimalepisoms führte, wurde in einem weiterführenden Versuchsansatz auf die Generierung des Minimalepisoms über die hier vorliegende Expression des eGFP-Gens selektiert.

2.3.2. Anreicherung des Exzisionsereignisses über einen „Promotor-Trap“ nach der Flp-vermittelten Exzision

Das in Kapitel 2.3 vorgestellte System zur Exzision eines Minimalepisoms aus einem stabil ins Genom integrierten Vektor, sollte im Folgenden auf eine Weise modifiziert werden, die es erlaubt, gezielt auf die Generierung des Episoms nach einer erfolgreichen Exzision zu selektieren. Im Vektor pEpi-FGSARF steht das eGFP-Gen unter der Kontrolle des cmv-Promotors. Bei einer Deletion des Promotors vor der stabilen Integration des Vektors in einer Einzelkopie ins Genom erhält man Klone, die keine eGFP-Expression aufweisen. Nach Flp-vermittelter Rekombination kommt es infolge der Zirkularisierung zu einer Regenerierung der Expression durch den SV40-Promotor. Demnach enthalten die Zellen, die eine eGFP-Expression aufweisen, den episomal replizierenden Vektor.

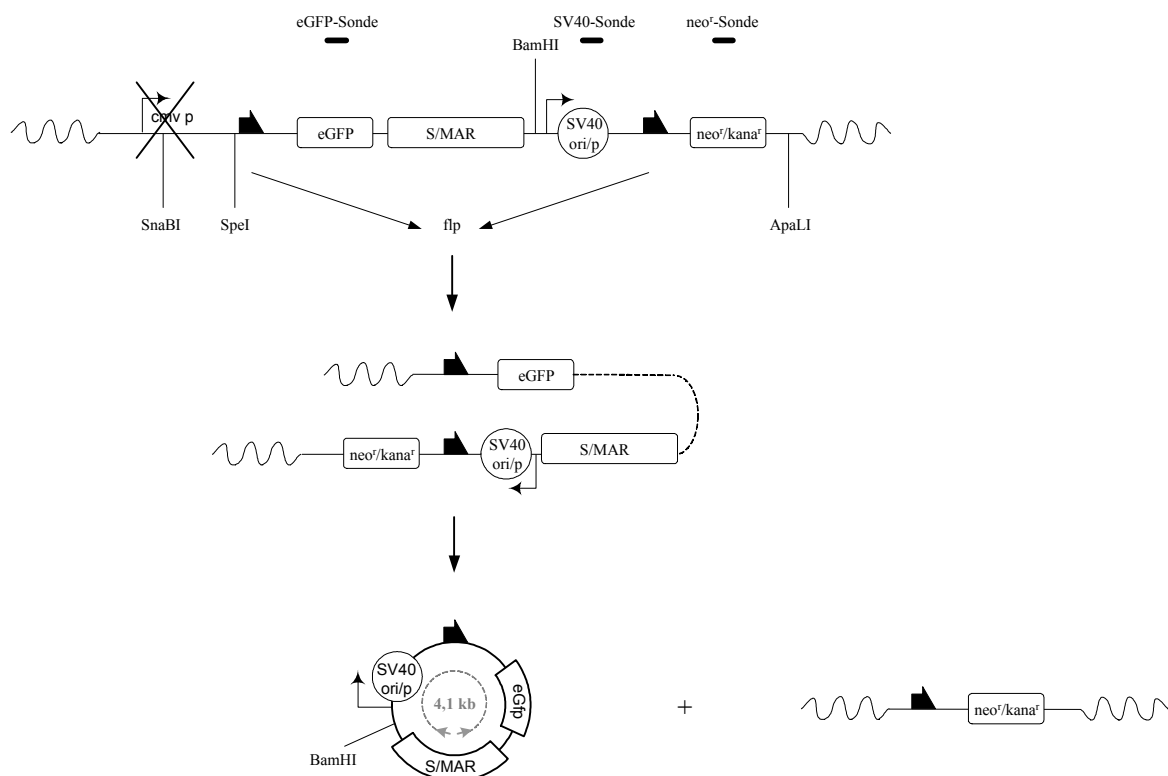


Abb. 2.15: Exzision und Regeneration der Expression durch einen „Promotor-Trap“.

Analog zu Abb. 2.13 ist hier das stabil ins Genom integrierte Konstrukt pEpi-FGSARF dargestellt. Vor der Integration in CHO-K1-Zellen wurde an dieser Stelle eine Deletion des cmv-Promotors vorgenommen. Die Überprüfung der Kopienzahl des Vektors erfolgte durch eine Southern Blot Analyse nach Restriktion der DNA mit dem Enzym BamHI und anschließender Hybridisierung mit einer 5'- und einer 3'-von der BamHI-Site gelegenen Sonde (schwarze Balken). Nach der transienten Expression der Flp-Rekombinase erfolgt die Exzision des zwischen den FRT-Sites befindlichen Vektoranteils.

Eine erfolgte Exzisionsreaktion kann hierbei nicht über eine PCR Analyse nachgewiesen werden, da der nach einer Exzisionsreaktion im Genom verbleibende Vektoranteil (FRT-Site und neo^r/kan^r) auch ohne Exzision in der gleichen Anordnung schon im Genom vorliegt (vgl. erste und letzte Zeile). Das exzisierte Minimalepisom hingegen kann durch Southern Blot Analyse nach BamHI-Restriktion und Hybridisierung mit einer geeigneten Sonde, sowie durch eine PCR Analyse, bei der der gesamte Vektor amplifiziert wird, nachgewiesen werden.

2.3.2.1. Generierung von Klonen zur Regeneration der Expression nach Exzision

Zur Generierung von Klonen, die das Konstrukt pEpi-FGSARF ohne cmv-Promotor stabil in das Genom integriert enthalten, wurden in zwei verschiedenen Ansätzen CHO-K1-Zellen elektroporiert. Nach G418-Selektion wurden insgesamt für Ansatz A (Linearisierung durch SpeI/ApaLI, s. Abb. 2.15) 72 Einzelklone und für Ansatz B (Linearisierung durch SnaBI/ApaLI) 33 Einzelklone generiert, die nach der DNA-Isolierung auf die vollständige Integration der 5' FRT-Site überprüft wurden, da es beim Prozess der Integration eines Vektors in das Genom zu einem Verlust einzelner Basenpaare an den Enden der eingebrachten Vektorsequenzen kommen kann. Die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym SpeI befindet sich in diesem Vektor in unmittelbarer Nähe (12 bp) zur 5' vom eGFP-Gen gelegenen FRT-Site. SnaBI schneidet den Vektor im cmv-Promotor. Die Vollständigkeit des integrierten Konstrukts wurde mittels PCR überprüft. Das Primerpaar *exftr/exsar* (s. Abb. 2.16) führt bei vollständiger Integration des Konstrukts im 5' Bereich in der PCR zu einem Amplifikat mit einer Größe von 1,2 kb. Der Primer *exftr* bindet dabei einen Bereich, der direkt zwischen der SpeI-Schnittstelle und der FRT-Site beginnt und sich bis in die FRT-Site hinein fortsetzt. Für fünf der generierten Einzelklone aus Ansatz A (6,9 %) und drei der Einzelklone aus Ansatz B (9,1 %) konnte dieser Vektoranteil, ebenso wie der 3' Bereich, vollständig amplifiziert werden.

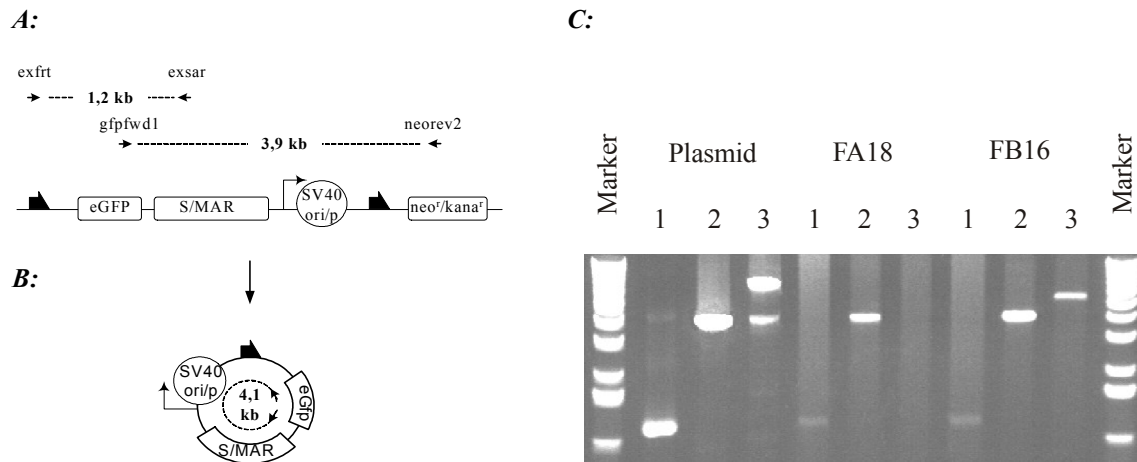


Abb. 2.16: Vollständigkeitsüberprüfung der integrierten Vektoren.

A: Schematische Darstellung des integrierten Vektors, sowie der zur Vollständigkeitsüberprüfung verwendeten Primer.

B: Der episomale Vektor nach der Exzision. Das Primerpaar *gfpwd1/gfprev1* liefert hierfür ein 4,1 kb-Fragment.

C: Dargestellt sind die mittels PCR amplifizierten Fragmente, die auf eine vollständige Integration des Vektors *pEpi-FGSARF* mit deletiertem *cmv*-Promotor in den Klonen Δ FA18 und Δ FB16 hinweisen. Als Kontrolle wurde Plasmid-DNA des *pEpi-FGSARF* verwendet. Primerpaare und erwartete Fragmentgrößen:

1: *exfrit/exsar* \rightarrow 1,2 kb. 2: *gfpwd1/neorev2* \rightarrow 3,9 kb. 3: *gfpwd1/gfprev1* \rightarrow 7,1 kb (ungeschnittene Plasmid-DNA), 6,0 kb (Tandemintegration), 4,1 kb (gezielte Exzision nach Rekombination bzw. Spontanexzision). Marker: 1 kb-Leiter.

Die Southern Blot Analyse dieser Klone zeigte, dass es sich um drei Einzelkopieklone (Δ FA10, Δ FA14 und Δ FB24), drei Klone mit je zwei Kopien (Δ FA18, Δ FB16 und Δ FB22), sowie um zwei weitere Klone mit drei (Δ FA27) bzw. vier Kopien des Integrats (Δ FA17) handelte (Daten nicht gezeigt).

In dieser Southern Blot Analyse konnte für einige der Klone nach Hybridisierung mit einer Sonde aus dem Bereich des eGFP-Gens zusätzlich zu den Banden, die auf Randfragmente schließen ließen, eine spezifische Bande bei etwa 4 kb detektiert werden. In Kapitel 2.3.1.1 wurde bereits dargestellt, dass die in der PCR als Positivkontrolle stets verwendete Plasmid-DNA einen gewissen Anteil spontaner Exzision ohne Rekombinase zeigte, was auf die durch S/MAR-Sequenzen vermittelte erhöhte Rekombinogenität zurückzuführen sein kann (Bode et al., 2000b). An dieser Stelle wurden daher die hier generierten Parentalklone vor der anschließenden Exzision auf Spontanexzision überprüft. Dazu wurde die aus den Klonen isolierte Gesamt-DNA für die Amplifikation des eigentlich erst nach Rekombinasetransfektion entstehenden Minimalepisoms verwendet. Das Primerpaar *gfpwd1/gfprev1* lieferte dabei für 75 % der Klone bei der PCR Analyse ein Fragment bei 4,1 kb. Dies trat bei den Klonen mit Mehrfachintegrat zusätzlich zu einem etwa 6,0 kb

großen Fragment auf, welches in diesen Klonen auf eine Integration des Konstrukts in Tandemanordnung schließen ließ. Die Spontanexzision trat dabei unabhängig von der integrierten Kopienzahl auf. Zudem konnte für die Klone mit Spontanexzision die Stabilität des exzisierten Vektoranteils auch über einen längeren Zeitraum nachgewiesen werden.

Im Folgenden wurde die Exzision des Minimalepisoms an den Klonen Δ FA18 und Δ FB16 untersucht.

2.3.2.2. Expressionsdaten der Klone mit vollständig integrierten Konstrukten

Da entsprechend der hier vorgestellten Selektionsstrategie die Exzision des eGFP-enthaltenen Konstrukts pEpi-FGSARF zu einer Regeneration der eGFP-Expression sollte, wurde überprüft, inwieweit die parentalen Klone Δ FA18 und Δ FB16 eine eGFP-Expression aufweisen.

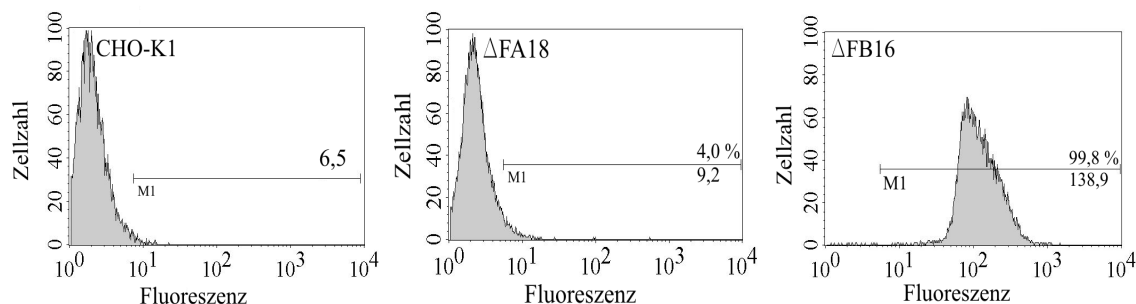


Abb. 2.17: Histogramm-Plots der Parentalklone.

Dargestellt ist die Zellzahl über der Fluoreszenzintensität. Die Grenze M1 markiert den Bereich exprimierender Zellen. Der Anteil der Zellen, die sich im M1-Bereich befinden ist in Prozent angegeben, die durchschnittliche Fluoreszenzintensität dieser Zellen ist darunter dargestellt.

In einer FACS Analyse (s Abb. 2.17) wurde festgestellt, dass der Klon Δ FA18 einen Anteil exprimierender Zellen von 3,96 % zeigte, die zudem eine sehr geringe Expressionshöhe aufwiesen. Im Klon Δ FB16 exprimierten auch ohne vektoriiellen Promotor 99,69 % der Zellen mit einer relativen Fluoreszenzintensität von 138,88. Daher schien eine Transfektion des Klons Δ FB16 zunächst nicht sinnvoll, da durch die bereits vorhandene Expression nicht auf eine Regeneration der Expression nach Transfektion selektiert werden konnte. Die hier vorliegende Expression könnte zum einen darin begründet sein, dass es

sich bei Klon Δ FB16 um einen Klon mit zwei in tandem angeordneten Kopien des Integrats handelt (s. Abb. 2.16). Durch die vorliegende *head-to-tail*-Anordnung befindet sich das eGFP-Gen auch im integrierten Zustand bereits unter der Kontrolle des SV40-Promotors der zweiten integrierten Kopie und wird exprimiert. Zum anderen könnte hier die zufällige Integration des Vektors in einen genomischen Locus stattgefunden haben, in dem der integrierte Vektor durch einen endogenen Promotor seine Expression regenerieren konnte. Zur Klärung wurde für die beiden Klone Δ FA18 und Δ FB16 eine Transfektion mit dem Flp-Rekombinaseplasmid durchgeführt.

2.3.2.3. Rekombinase-vermittelte Exzision eines Minimalepisoms in Subklon-gemischen

Da der Klon Δ FB16 bereits vor der Rekombinasetransfektion eine eGFP-Expression aufwies, wodurch die Selektion auf exprimierende Zellen nach Exzision erschwert wurde, sollte in einem Vorversuch geklärt werden, ob in diesem Klon eine Transfektion mit Flp-Rekombinase überhaupt sinnvoll ist. Dazu wurden zunächst Untersuchungen an Subklonmischungen des Δ FB16 und auch des Δ FA18 durchgeführt, die durch die Transfektion mit dem Rekombinaseplasmid pFlpe und eine transiente Puromycinselektion entstanden sind. Hierfür wurde die Gesamt-DNA dieser Zellen isoliert, sowie eine Messung der eGFP-Expression vorgenommen. Die DNA wurde zur Analyse mittels PCR herangezogen, wobei unter Verwendung der Primer *gfp fwd1/gfp rev1* (s. Abb. 2.16) der Nachweis einer erfolgten Exzision durch die Amplifikation des gesamten zu exzisierenden Vektoranteils erbracht werden sollte (Daten nicht gezeigt). Im Klon Δ FA18 konnte keine Exzision nachgewiesen werden. Der Klon Δ FB16 hingegen zeigte nach der Exzisionsreaktion eine deutliche Bande bei 4,1 kb in der PCR, welche auf die erfolgreiche Exzision in diesem Klon hinwies. Zur Verifizierung dieser Daten wurde zusätzlich eine Southern Blot Analyse durchgeführt (s. Abb. 2.18).

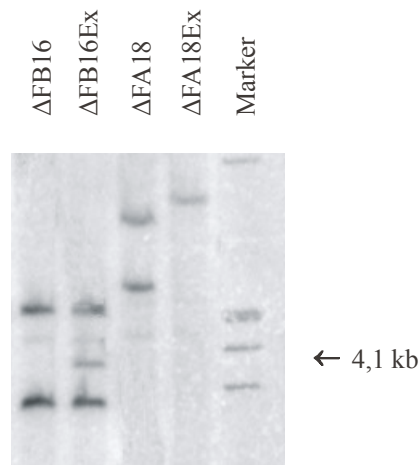


Abb. 2.18: Überprüfung der Exzision in Subklongemischen in der Southern Blot Analyse.

Die DNA der zur Exzision herangezogenen Parentalklone und der nach Rekombinase-Transfektion generierten Subklongemische wurde mit dem Enzym BamHI geschnitten und mit einer SV40-Sonde hybridisiert. Die Bande bei einer Größe von 4,1 kb stellt dabei das exzisierte Minimalepisom dar. Marker: λ HindIII/EcoRI, S^{35} markiert.

Hierbei konnte nach Restriktion der Gesamt-DNA mit dem Enzym BamHI und anschließender Hybridisierung mit einer Sonde, die im Bereich des SV40 Promotors bindet, ebenfalls die nach erfolgreicher Exzision im Klon Δ FB16 auftretende spezifische Bande bei 4,1 kb nachgewiesen werden. Für den Klon Δ FA18 konnte auch hier kein Nachweis auf eine Exzision erbracht werden.

Die Exzisionsreaktion ist demnach im Subklongemisch durchführbar und sowohl über eine PCR als auch über eine Southern Blot Analyse nachweisbar. Da in diesem Versuchsansatz die Anreicherung der Exzisionsreaktion über eine Regeneration der Expression durch das exzisierte Minimalepisom stattfinden sollte, der Klon Δ FB16 jedoch schon vor der Exzision eine Expression aufwies, wurden die Subklongemische zusätzlich in der FACS Analyse auf eine Veränderung in ihren Expressionseigenschaften nach der Rekombinasetransfektion untersucht (s. Abb. 2.19).

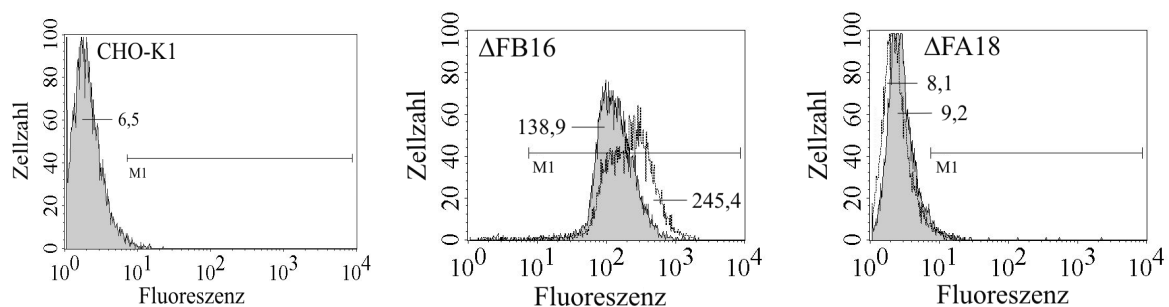


Abb. 2.19: FACS Analyse der Subklongemische.

Histogramm-Plots der Parentalklone (grau hinterlegt) im Vergleich zu den nach Rekombinase-Transfektion generierten Subklongemischen (gestrichelte Linie). Dargestellt ist die Zellzahl über der Fluoreszenzintensität.

Die Expressionsanalyse des Klons Δ FA18 lieferte vor der Exzisionsreaktion einen Anteil exprimierender Zellen von 3,96 %. Nach der Transfektion mit dem Rekombinaseplasmid konnte hier nur eine geringe Erhöhung des Anteils exprimierender Zellen auf 6,09 % erreicht werden. Die relative Fluoreszenzintensität hat sich dabei verringert. Laut der vorangegangenen Untersuchungen hat in diesem Klon keine Exzision stattgefunden. Dies konnte zu diesem Zeitpunkt auf eine zu geringe Transfektionseffizienz oder eine in diesem Klon vorliegende Veränderung in der Funktionalität der FRT-Sites hinweisen.

Für Klon Δ FB16 konnte sowohl vor als auch nach der Transfektion eine Expression in nahezu 100 % der Zellen festgestellt werden. Zudem ist eine Verschiebung der relativen Fluoreszenzintensität von 138,88 auf 245,42 zu verzeichnen. Diese Erhöhung der Expression steht damit in direkter Relation zur Generierung des Minimalepisoms nach der Exzision. Auch vor der Exzision stand durch die Tandemintegration des Vektors pEpi-FGSARF das eGFP-Gen unter der Kontrolle des SV40-Promotors. Im integrierten Zustand befand sich allerdings die *neo'*-Kassette zwischen SV40-Promotor und eGFP-Gen, wodurch eventuell eine Abschwächung der Promotorfunktion auf die eGFP-Expression stattgefunden hat. Erst nach der Exzision befindet sich der Promotor unmittelbar im 5' Bereich des Gens. Daher konnte zunächst davon ausgegangen werden, dass in den Zellen, in denen eine Expressionserhöhung stattgefunden hat, die Exzision des Minimalepisoms erfolgreich war. Da es sich in diesem Ansatz um Subklongemische handelte und somit ein Mischzustand aus der integrierten und der exzisierten Form des Vektors vorlag, sollten im weiteren Verlauf dieser Arbeit Einzelklone generiert werden, die ausschließlich das exzisierte Minimalepisom enthalten, da nur hierfür spezifische Aussagen über die Stabilität des episomalen Zustands und die Expressionseigenschaften gemacht werden können.

2.3.2.4. Exzision eines Minimalepisoms über verschiedene Selektionsstrategien

Zur Exzision der Minimalepisomen wurden zwei verschiedene Selektionssysteme verwendet. Zum einen fand eine Anreicherung hochexprimierender Zellen über eine FACS-Sortierung statt. Analog der in Kapitel 2.3.1.1 beschriebenen Generierung von Einzelklonen über eine FACS-Sortierung nach der Transfektion mit dem

Rekombinaseplasmid pFRFus wurde auch für die Klone Δ FB16 und Δ FA18 verwendet. Von beiden Klonen wurden die Zellen mit pFRFus transfiziert und auf das *neo^r*-Gen enthaltene Rekombinaseplasmid selektiert. Danach wurde der Selektionsdruck entfernt. Die Zellen wurden vor der anschließenden FACS-Sortierung bereits auf eine erfolgte Exzision im Subklongemisch, sowie auf ihr Expressionsverhalten überprüft. Dabei konnte auch hier für Klon Δ FB16 eine Exzision mittels PCR detektiert werden, nicht aber für Klon Δ FA18. Auch das Expressionsverhalten unterschied sich kaum von dem der Subklongemische in Kapitel 2.3.2.3. Für beide Klone wurde eine Sortierung von Einzelzellen vorgenommen, die sowohl eGFP als auch RFP exprimieren. Die so generierten Subklone wurden nach der Isolierung der Gesamt-DNA auf ihren Gehalt an Minimalepisomen untersucht.

Zum anderen gab die erfolgreiche Exzision im Subklongemisch nach transienter Expression des Rekombinaseplasmids pFlpe in Kapitel 2.3.2.3 den Anlass, Einzelklone aus dem Gemisch zu isolieren. Daher wurden die Zellen der Klone Δ FB16 und Δ FA18 mit pFlpe transfiziert und nach transienter Puromycinselektion auf das Rekombinaseplasmid Einzelklone zur weiteren Analyse herangezogen.

Die unterschiedlichen Anreicherungsstrategien mit zwei verschiedenen Rekombinaseplasmiden ermöglicht vergleichende Aussagen über die Verwendbarkeit der beiden Systeme.

2.3.2.5. Feststellung der Exzision des Episoms in den Einzelklonen

Nach der Transfektion der Parentalklone Δ FB16 und Δ FA18 mit den Rekombinaseplasmiden pFRFus bzw. pFlpe wurden die generierten einzelnen Subklone auf eine erfolgreiche Exzision des Minimalepisoms untersucht. Der Nachweis wurde direkt über die Entstehung des exzisierten Minimalepisoms mittels PCR unter Verwendung des Primerpaars *gfp fwd1/gfp rev1* erbracht. In beiden Parentalklonen lagen laut Southern Blot Analyse zwei in tandem angeordnete Kopien des integrierten Vektors vor. Für Klon Δ FB16 war es daher mit dem genannten Primerpaar möglich, ein Fragment mit einer Größe von etwa 6,1 kb zu amplifizieren. In Klon Δ FA18 hingegen war diese Amplifikation nicht möglich, da in diesem sowohl eine vollständige Kopie, sowie ein Teilfragment des Vektors vorzuliegen schien, da in der Southern Blot Analyse bei der Verwendung einer gegen den SV40-Promotor gerichteten Sonde zwei Banden sichtbar waren (s. Abb. 2.18), bei der Verwendung einer eGFP-Sonde jedoch nur eine (Daten nicht gezeigt).

Für den Parentalklon Δ FA18 wurden durch die Einzelklonsortierung nach Transfektion mit pFRFus insgesamt 46 Subklone in der PCR untersucht. Für keinen dieser Subklone konnte eine Exzision des spezifischen Vektoranteils festgestellt werden. Ebenso waren die durch pFlpe-Transfektion entstandenen Subklone nicht exzidiert. In diesem Parentalklon war vor der Exzisionsreaktion nahezu keine Expression detektierbar. Deren Regenerierung sollte nach der Exzision als Selektion auf Minimalepisomen verwendet werden. Durch die nur sehr geringe Erhöhung der Expression nach der Rekombinasetransfektion war bereits angenommen worden, dass die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Minimalepisombildung sehr gering war. Dies wurde demnach hier bestätigt.

Für den Parentalklon Δ FB16 wurden insgesamt 65 der nach der Sortierung auf die Expression von RFP in den eGFP-hochexprimierenden Zellen entstandenen Subklone auf die Exzision des Minimalepisoms untersucht. Der Nachweis einer erfolgreichen Exzision wurde für acht dieser Subklone über die charakteristische PCR-Reaktion unter Verwendung der Primer *gfp fwd1/gfp rev1* erbracht (s. Abb. 2.20, A). In einer Southern Blot Analyse konnte die Exzision in den acht Subklonen verifiziert werden (s. Abb. 2.20, B). Durch diese zusätzliche Absicherung konnte eine mögliche Re-Integration des Vektors an eine andere Stelle im Genom nach der Exzision ausgeschlossen werden. Der analoge Ansatz unter transienter Expression der auf dem Konstrukt pFlpe befindlichen Rekombinase lieferte einen erfolgreich exzidierten Subklon (Δ FB16Exp7).

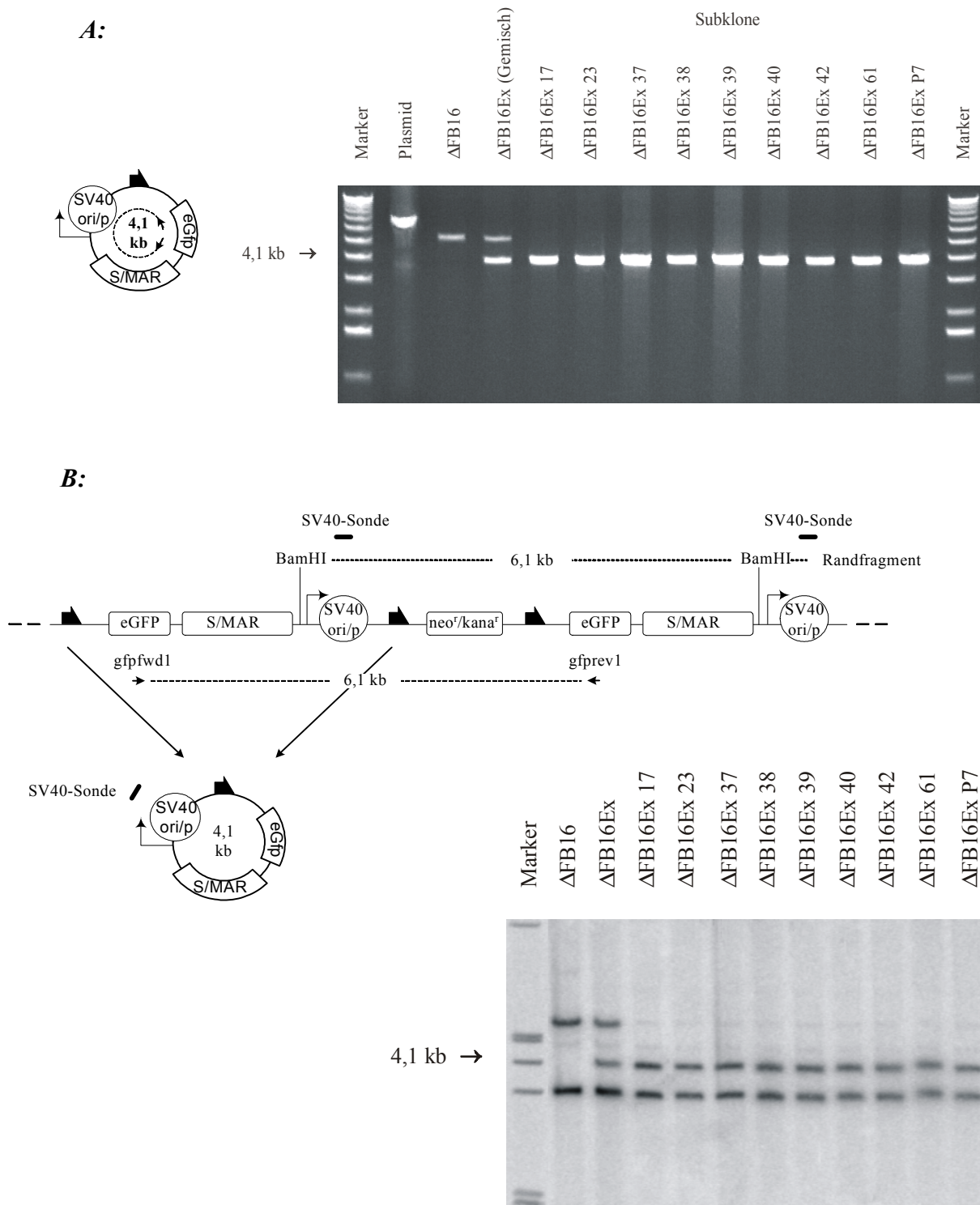


Abb. 2.20: Überprüfung der Exzision des Minimalepisoms in den Subklonen des Δ FB16.

A: PCR Analyse des Parentalklons Δ FB16, des Subklongemischs und der nach Transfektion mit pFRFus und anschließender Sortierung hochexprimierender Zellen, sowie der nach Transfektion mit pFlpe generierten einzelnen Subklone. In den hier gezeigten Subklonen hat eine spezifische Exzision stattgefunden. Dies konnte durch die Verwendung der Primer gfpwd1/gfprev1, welche zur Amplifikation des gesamten exziierten Vektoranteils mit 4,1 kb führen, gezeigt werden.

B: Dargestellt ist eine Southern Blot Analyse der selben Klone wie bereits unter A: beschrieben. Durch die Restriktion der Gesamt-DNA mit BamHI und anschließende Hybridisierung mit einer SV40-Sonde konnte die spezifische Bande mit einer Größe von 4,1 kb generiert werden. Zusätzlich trat hier in den Subklonen der im zellulären Genom verbleibende Anteil des Vektors als Randfragment auf, wohingegen das Verschwinden des größeren 6,1 kb-Randfragments auf die Exzision des Minimalepisoms zurückzuführen ist. Marker: λ HindIII/EcoRI, S^{35} markiert.

Im Subklongemisch des Δ FB16, im Folgenden als Δ FB16Ex bezeichnet, konnten sowohl in der PCR als auch in der Southern Blot Analyse charakteristische Banden für einen in diesen Zellen vorliegenden Mischzustand von integriertem und exzisierten Vektoranteil detektiert werden (s. Abb. 2.20, A und B).

Acht der 65 Subklone (12,3 %) aus der pFRFus-Transfektion wiesen eine vollständige und spezifische Exzision des Minimalepisoms auf, was durch das Auftreten der 4,1 kb Bande in beiden Analysen dargestellt werden konnte. Für weitere dreizehn Subklone (20 %) konnte ein Mischzustand aus Exzision und verbleibender Integration des Vektors nachgewiesen werden. Der prozentuale Anteil an nicht-exzisierten Subklonen war mit 67,7 % am größten (s. Tab. 2.3).

Von den 28 Subklonen, die nach transienter Expression des pFlpe-Rekombinaseplasmids entstanden sind, wies nur einer eine erfolgreiche Exzision des Minimalepisoms auf. Für diesen Ansatz war der Anteil der Subklone, in denen ein Mischzustand aus Exzision und verbleibender Integration des Vektors gezeigt werden konnte, mit 42,8 % relativ hoch. Dementsprechend lag der Anteil nicht-exzisierter Subklone mit 53,6 % unter dem Wert der bei der FACS-Sortierung generierten nicht-exzisierten Klone.

Verwendete Rekombinase	Anzahl der untersuchten Subklone	Prozentualer Anteil an exzisierten Subklonen	Prozentualer Anteil an exzisierten und nicht-exzisierten Subklonen	Prozentualer Anteil an nicht-exzisierten Subklonen
pFRFus	65	12,3 %	20 %	67,7 %
pFlpe	28	3,6 %	42,8 %	53,6 %

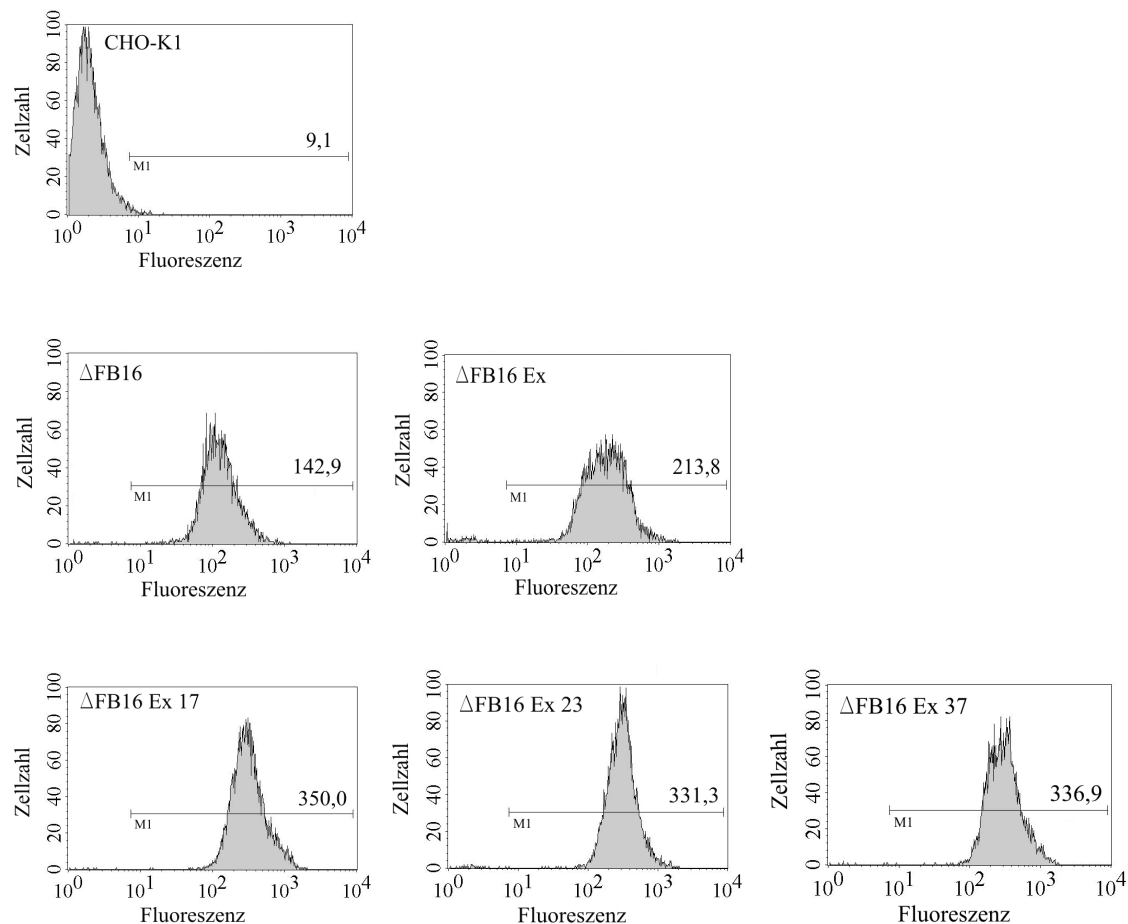
Tab. 2.3: Statistische Darstellung der Exzisionshäufigkeit in den Subklonen.

Dargestellt ist jeweils der prozentuale Anteil der Exzisionen, des Mischzustandes aus Exzision und verbleibender Integration und nicht stattgefundener Exzision bezogen auf die Gesamtanzahl der untersuchten Subklone. Dabei wurde zwischen den beiden hier verwendeten Rekombinasen unterschieden.

Vergleichend konnte hier also dargestellt werden, dass für die Generierung von Klonen, in denen die Exzision eines spezifischen Vektoranteils stattgefunden hat, die transiente Expression des Fusionsproteins aus RFP und Flp-Rekombinase und die anschließende Sortierung auf fluoreszierende Einzelzellen der Methode der transienten Puromycinselektion auf das Rekombinaseplasmid pFlpe vorzuziehen ist.

2.3.2.6. Langzeitstabilität der Exzisionsklone bezüglich ihrer Expression und des episomalen Status ohne Selektion

Um den Einfluss eines exzidierten Vektoranteils, bei dem durch Rezirkularisierung das zu exprimierende Gen fortan unter der Kontrolle des SV40-Promotors steht, auf die in diesen Zellen vorliegende Expressionshöhe zu überprüfen, wurden an den spezifisch exzidierten Subklonen des Δ FB16 FACS Analysen durchgeführt.



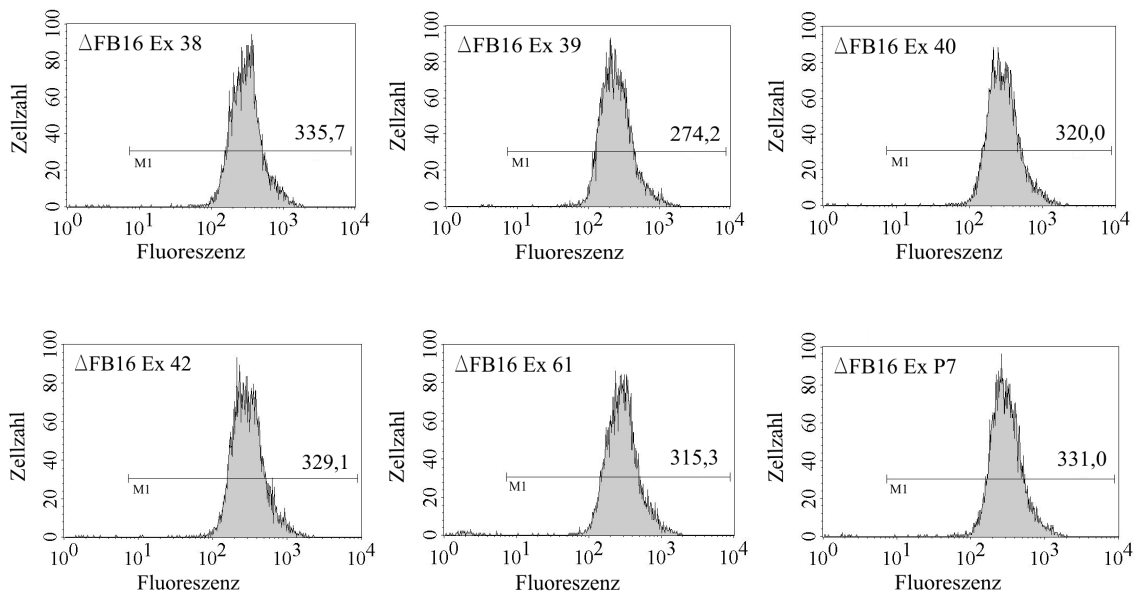


Abb. 2.21: Expressionsanalysen der erfolgreich exziierten Subklone des Δ FB16.

Histogramm-Plots des Parentalklons Δ FB16, dessen Subklongemisch und der nach Transfektion mit pFRFus bzw. pFlpe generierten einzelnen Subklone, in denen eine spezifische Exzision des Minimalepisoms stattgefunden hat. Die Zellzahl ist über der Fluoreszenzintensität aufgetragen. Die Höhe der Fluoreszenzintensität aller exprimierenden Zellen (M1) ist für jeden der Klone angegeben.

Für jeden der exziierten Subklone konnte in nahezu 100 % der Zellen eine eGFP-Expression detektiert werden. Dabei lag die relative Fluoreszenzintensität bei allen Subklonen, in denen eine Exzision stattgefunden hat, bei Werten zwischen 274,2 und 350,0 und war somit bei fast allen Subklonen mindestens doppelt so hoch wie im Parentalklon Δ FB16. Die Subklone wurden über einen Zeitraum von fünfzehn Passagen weiterhin ohne Selektionsdruck kultiviert, da sich kein Selektionsmarker im Minimalepisom befindet. In regelmäßigen Abständen wurde die Stabilität des episomalen Vektors in den Subklonen mittels PCR Analyse bestätigt. Zusätzliche Expressionsuntersuchungen zeigten stets stabile Fluoreszenzintensitäten für die einzelnen Subklone.

Es konnte hiermit gezeigt werden, dass die Exzision eines Minimalepisoms aus einem stabil im Genom integrierten Vektor mittels Flp-Rekombinase unter Verwendung unterschiedlicher Selektionssysteme möglich ist. Die dabei entstandenen Minimalepisomen wiesen eine stabile Expression ohne das Vorliegen eines Selektionsdrucks über einen Zeitraum von mindestens fünfzehn Passagen auf. Der episomale Zustand des exziierten Vektoranteils konnte dabei stets nachgewiesen werden.

Somit wurde durch die Verwendung einer sequenzspezifischen Flp-vermittelten Rekombination ein System zur Generierung von Minimalepisomen etabliert. Die Deletion unerwünschter prokaryontischer Vektorsequenzen zur Verbesserung der Funktion des episomal replizierenden Vektors sowie seiner biologischen Sicherheit für

gentherapeutische Fragestellungen wurde erreicht. Dieser Vektor kann zudem in zukünftigen Ansätzen zur Ausweitung der Klonierungskapazität genutzt werden, wobei Gene unterschiedlichster Art und Größe inseriert und episomal repliziert werden können. Da die Funktionalität einer Cre-Rekombinase-vermittelten Inversion im episomal replizierenden Vektor sowie einer Flp-vermittelten Exzision eines Minimalepisoms in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnten, ergibt sich die Möglichkeit im episomalen Vektorsystem das Kassettenaustauschverfahren (RMCE, „*Recombinase-Mediated Cassette Exchange*“) zu nutzen. Dabei können unterschiedliche regulatorische Elemente in einen episomalen Vektor spezifisch über ein Rekombinationsereignis eingebracht und ihre Funktionalität überprüft werden (s. Kapitel 3.6.2).

2.4. Entwicklung einer Antikörperproduzierenden CHO-K1-Zelllinie

Um den universellen Einsatz des in dieser Arbeit vorgestellten Vektorsystems zu untersuchen, wurde das Reportergen eGFP im Vektor pEpi-1 durch Gene ersetzt, die jeweils für die leichte (pEpi-K) bzw. schwere Kette (pEpi-H) eines IgG-Moleküls (s. Kapitel 4.13) kodieren. Dabei sollte unter anderem der Aufbau eines Co-Expressionssystems zweier episomal in einer Zelle replizierenden Vektoren erfolgen. Ein weiteres Konstrukt, in dem beide Antikörperketten hintereinander, jeweils unter der Kontrolle eines eigenen cmv-Promotors und in gleicher Transkriptionsrichtung, angeordnet sind (pEpi-HK), wurde zu Vergleichszwecken kloniert (s. Abb. 2.22).

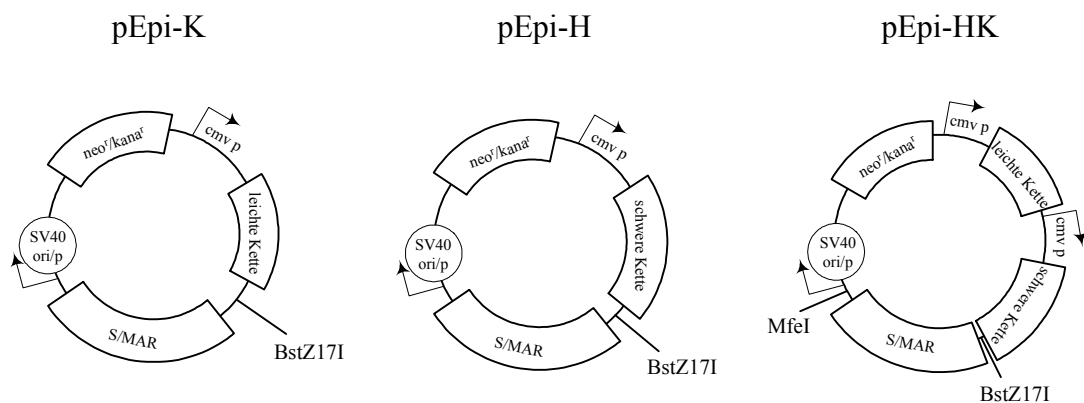


Abb. 2.22: Schematische Darstellung der Antikörper-Vektoren.

Dargestellt sind die Vektoren, in denen ein Austausch der eGFP-Expressionseinheit gegen verschiedene Gene, die Antikörperketten kodieren, stattgefunden hat. Dabei wurde das eGFP-Gen im Plasmid pEpi-eGFP durch das Gen, welches die leichte Kette des IgG-Moleküls kodiert (pEpi-K), bzw. durch das Gen, wodurch die schwere Kette exprimiert werden kann (pEpi-H) ausgetauscht. Das Plasmid pEpi-HK entstand aus pEpi-K durch das Einbringen der Transkriptionseinheit der schweren Kette im 3' Bereich der leichten Kette. Größen der Plasmide: pEpi-K: 7,7 kb, pEpi-H: 8,8 kb, pEpi-HK: 11,9 kb.

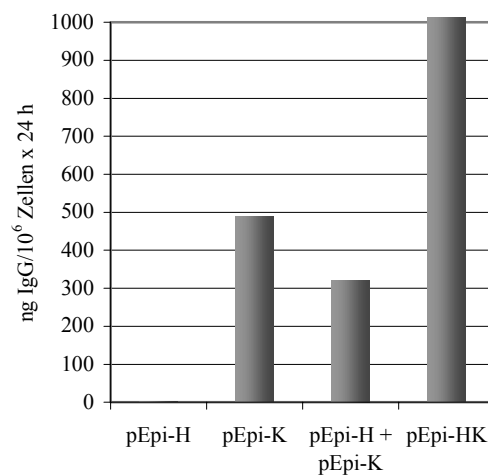
2.4.1. Überprüfung der Antikörperexpression

Die konstruierten Vektoren pEpi-K, pEpi-H und pEpi-HK sollten zunächst auf die Expression ihrer jeweiligen Antikörperketten überprüft werden. Dazu wurden diese in CHO-K1-Zellen elektroporiert. Da zu einem späteren Zeitpunkt ein Co-Expressionssystem, bestehend aus den simultan in einer Zelle vorliegenden Vektoren pEpi-K und pEpi-H, entwickelt werden sollte, wurden an dieser Stelle zusätzlich beide Vektoren gemeinsam in

CHO-K1-Zellen eingebracht. Nach einer G418-Selektion wurden verschiedene Expressionsanalysen an den somit entstandenen Klongemischen durchgeführt. Der Anteil der exprimierten und sekretierten Antikörperbestandteile aus den verschiedenen verwendeten Vektoren wurde mittels *ELISA* bestimmt (s. Abb. 2.23, A).

Zusätzlich wurde eine Expressionsanalyse des intrazellulären Anteils der Antikörperbestandteile mittels zytoplasmatischer Antikörperfärbung durchgeführt (s. Abb. 2.23, B). Dabei wurden die Zellen durch Paraformaldehyd fixiert und durch die Zugabe eines FITC-markierten Antikörpers, der spezifisch sowohl die leichte als auch die schwere Kette des in der Zelle exprimierten Antikörpers bindet, konnte in der FACS Analyse der intrazelluläre Anteil des Antikörpers nachgewiesen werden.

A:



B:

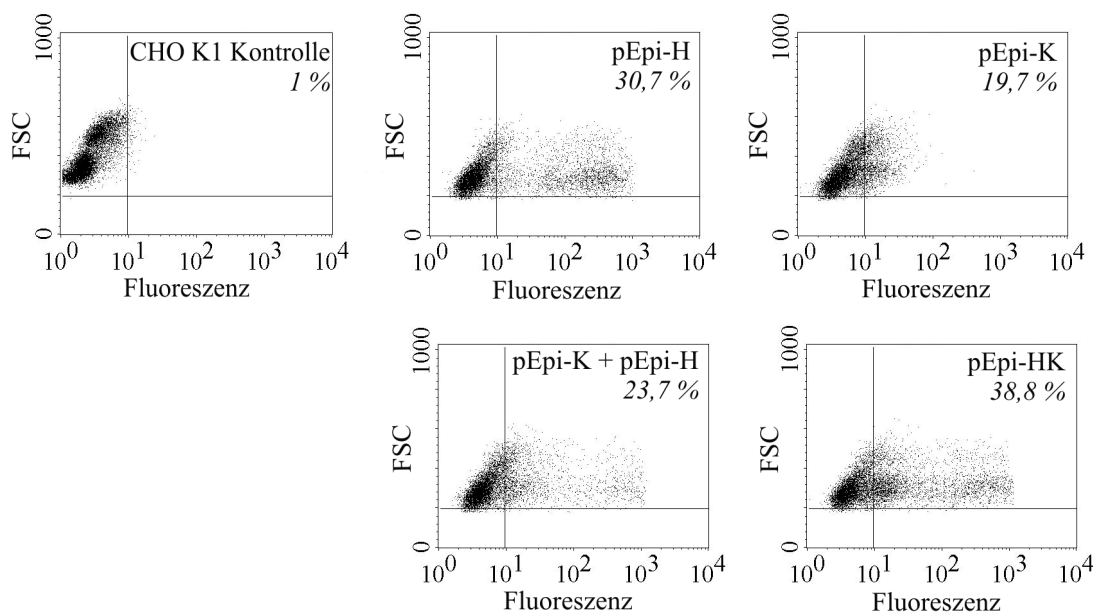


Abb. 2.23: Expressionsanalyse des sekretierten und des intrazellulären Anteils des Antikörpers in Klongemischen.

A: Die Graphik zeigt die Menge sekretierten IgGs der mit den verschiedenen Antikörperketten-haltigen Vektoren elektroporierten Klongemischen.

B: Die Expression von nicht transfizierten CHO-K1-Zellen und den mit den verschiedenen Vektoren transfizierten Klongemischen ist als Dot-Plot-Auftragung dargestellt. FSC („forward scatter“) = Zellgröße. Die Zahlen geben den Prozentsatz der im oberen rechten Quadranten befindlichen Zellen an.

Durch die zytoplasmatische Antikörperfärbung konnte gezeigt werden, dass jede der Antikörperketten exprimiert wird und in der Zelle vorliegt. Zieht man die ELISA-Daten (s. Abb. 2.23, A) als Vergleich heran, so konnte dort für das Gemisch, welches ausschließlich mit dem Vektor, der die schwere Kette enthält, elektroporiert wurde, nahezu keine Expression detektiert werden. Die zytoplasmatische Analyse (s. Abb. 2.23, B) zeigte jedoch, dass in 30,7 % der Zellen eine Expression der schweren Kette erfolgte. Dies ließ die Vermutung zu, dass die alleinige Expression der schweren Kette des IgG-Moleküls wahrscheinlich durch eine Fehlfaltung im Endoplasmatischen Retikulum keine Sekretion dieses Anteils zulässt. Bestätigen konnte dies die zytoplasmatische Analyse der Klongemische, in denen beide Antikörperketten simultan entweder im gleichen Vektor (pEpi-HK) oder im Co-Expressionssystem auf zwei verschiedenen Vektoren (pEpi-K + pEpi-H) vorliegen. Für beide Klongemische konnten infolge einer hohen Gesamtexpression sowohl hohe sekretierte als auch intrazelluläre Anteile gezeigt werden. Die intrazelluläre Expression der leichten Kette allein hingegen war mit einem Anteil exprimierender Zellen von 19,7 % relativ gering. Die Sekretion dieses Antikörperbestandteils, die im ELISA bestimmt wurde, war jedoch mit 489 ng IgG sogar höher als im Coexpressionssystem, in dem 322 ng IgG sekretiert wurden.

Es konnte an dieser Stelle somit gezeigt werden, dass die Expression der einzelnen Antikörperketten unter der Kontrolle des cmv-Promotors möglich und abhängig vom verwendeten Vektorsystem unterschiedlich ist.

2.4.2. Generierung episomal replizierender Vektoren zur Antikörperexpression

Da in den vorangegangenen Kapiteln der vorliegenden Arbeit bereits die Notwendigkeit von Einzelklonen zur definierten Bestimmung des episomalen Zustands in einer Zelle und die damit verbundene spezifische Expression dargestellt wurde, sollten im Folgenden analog für die definierte Analyse der antikörperexprimierenden Vektorsysteme Einzelklone generiert werden. Dabei sollten zum einen Klone, die den Vektor pEpi-HK episomal replizieren, zum anderen Klone, die die Vektoren pEpi-K und pEpi-H simultan episomal enthalten, entstehen. Ein Vergleich dieser beiden Systeme sollte somit einen Hinweis auf

die Nutzbarkeit eines Vektors, bei dem beide Antikörperketten auf demselben Vektor vorliegen und zudem beide jeweils unter der Kontrolle des *cmv*-Promotors exprimiert werden, geben. Durch die Entwicklung eines Co-Expressionssystems, bei dem beide Antikörperketten auf unabhängigen episomal replizierenden Vektoren vorliegen, sollten die eventuell auftretenden Expressionsprobleme durch Promotorinterferenzen im Vektor pEpi-HK umgangen werden.

Bei der Elektroporation von CHO-K1-Zellen wurden 21 Einzelklone, die mit dem Vektor pEpi-HK elektroporiert wurden, isoliert, sowie 31 Einzelklone, die nach Elektroporation die Vektoren pEpi-K und pEpi-H enthalten. Eine anschließende Southern Blot Analyse wurde zur Ermittlung des Status der Vektoren in den Einzelklonen herangezogen (Daten nicht gezeigt). Die Linearisierung und die anschließende Hybridisierung der isolierten DNA lieferte für diesen Ansatz keine Hinweise auf den episomalen Zustand dieser Vektoren in den Zellen. Vielmehr hat sowohl im Co-Expressionssystem als auch in den Klonen mit dem Vektor pEpi-HK stets eine Integration des Vektors in das zelluläre Genom stattgefunden. Dies konnte durch verschiedene PCR-Analysen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt), wobei jeweils ein Großteil der Vektoren amplifiziert werden konnte. Dies wies zudem auf eine Tandemintegration der Vektoren hin.

Da bislang keine Erkenntnisse über die funktionelle Maximalgröße dieses episomalen Vektorsystems vorliegen, kann die Größe der Konstrukte eine mögliche Erklärung für die erfolglose Generierung episomal replizierender Einzelklone mit den verwendeten Vektoren sein. Während der zuvor verwendete Vektor pEpi-L1CG Δ pA1L eine Größe von 7,3 kb aufweist, ist der Vektor pEpi-HK mit 11,9 kb eventuell entscheidend größer, wodurch der episomale Status unter Umständen nicht aufrechterhalten werden kann.

Eine mögliche Erklärung dafür, dass für das hier vorgestellte Co-Expressionssystem aus den Vektoren pEpi-K und pEpi-H keine episomal replizierenden Vektoren nachgewiesen werden konnten, liefert die Selektion auf das Vorhandensein des *neo^r*-Gens in beiden Vektoren. Hierbei kann eine unausgeglichene Selektion stattgefunden haben, wobei der größere Vektor eventuell einem Selektionsnachteil in der Zelle unterliegt. Eine simultane Generierung zweier episomal replizierender Vektoren sowie deren Co-Expression kann dadurch zusätzlich erschwert werden. Im Folgenden wurde daher das Konzept zur Etablierung eines Co-Expressionssystems im Hinblick auf diese Problematiken verbessert.

2.4.3. Etablierung des Co-Expressionssystems

Zur Sekretion eines funktionellen Antikörpers ist die balancierte Expression der leichten und der schweren Antikörperkette Voraussetzung. Durch die Co-Expression der Vektoren pEpi-K und pEpi-H sollte ein System generiert werden, in dem nur Zellen mit annähernder 1:1 Expression beider Ketten überleben. Da jedoch keine episomal replizierenden Vektoren innerhalb dieses Co-Expressionssystems identifiziert werden konnten, wurde ein Konzept entwickelt, bei dem die beiden Antikörper-Vektoren sequenziell in einen CHO-K1-Zellklon eingebracht werden sollte. Dabei sollte zunächst ein Klon identifiziert werden, in dem der Vektor pEpi-K episomal repliziert. Eine anschließende Elektroporation mit dem Vektor pEpi-H sollte dann in einem vollständigen und funktionellen Co-Expressionssystem resultieren. In dem Konstrukt pEpi-H wurde hierfür ein Austausch des Selektionsmarkers Neomycinphosphotransferase durch Puromycinacetyltransferase vorgenommen (pEpi-HP, s. Abb. 2.24). Über die somit durchführbare Doppelsektion im Co-Expressionssystem auf das Vorhandensein beider Vektoren sollte es möglich sein, die Expression der Antikörperketten zu harmonisieren.

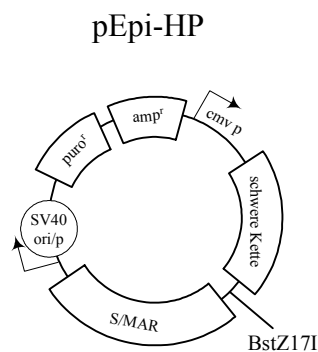


Abb. 2.24: Schematische Darstellung des Vektors pEpi-HP.

Das Vektorrückgrat des pEpi-H, welches ein Fusionsgen aus einer *neo^r/kan^r*-Kassette enthält, wurde deletiert und durch ein *puro^r*-vermittelndes Gen ersetzt. Das *amp^r*-Gen wird zur Selektion des Plasmids in Bakterien verwendet. Größe des Plasmids: 10,4 kb.

Für das vorgestellte Co-Expressionssystem, in dem die beiden Vektoren pEpi-K und pEpi-HP simultan exprimieren und somit ein funktionelles IgG-Molekül ausbilden, wurden zunächst Klone generiert, in denen ausschließlich die leichte Kette exprimiert wird. Die Elektroporation des Vektors pEpi-K in CHO-K1-Zellen und eine anschließende G418-Selektion lieferte insgesamt 44 Klone, die mittels Southern Blot Analyse auf das

Vorhandensein des episomal replizierenden Vektors überprüft wurden (Daten nicht gezeigt). Für sechs Klone konnte der episomal vorliegende Zustand des Vektors in der Zelle nachgewiesen werden. Dies wurde zusätzlich über eine PCR Analyse bestätigt (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde für die sechs Einzelklone eine Expressionsanalyse mittels ELISA durchgeführt (s. Abb. 2.25), wobei für zwei dieser Klone keine Expression nachweisbar war und daher für weitere Versuchsansätze nicht verwendet wurden.

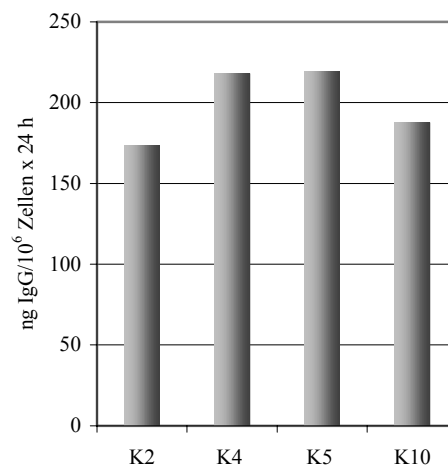


Abb. 2.25: Nachweis der IgG-Produktion mittels ELISA für die Klone, die die leichte Kette enthalten.

Der innerhalb von 24 Stunden in die Zellüberstände sekretierte Anteil der leichten Kette des IgG-Moleküls wurde mittels ELISA bestimmt und auf eine Zellzahl von $1 \cdot 10^6$ Zellen normiert.

Die exprimierenden Klone K4 und K5 wurden für den Zeitraum der Expressions- und Statusanalysen in Fetalem Kälberserum mit 5,6 % DMSO (s. Kapitel 4.10.5) eingefroren. Nach dem Auftauen zeigte eine erneute Southern Blot Analyse, dass beide Klone den episomalen Vektor ins Genom integriert hatten. Für die Klone K2 und K10 wurde hingegen auf das Einfrieren verzichtet. Diese exprimierten die leichte Kette und der Vektor zeigte hier eine stabile episomale Replikation. Daher wurden diese zur Generierung des episomalen Co-Expressionssystems verwendet.

Zur Anlage des Co-Expressionssystems wurden der Vektor pEpi-HP in Zellen der Klone K2 bzw. K10 elektroporiert. Anschließend wurde eine Doppelselektion auf die Neomycin-phosphotransferase- und Puromycin-Resistenz begonnen. Hierbei sollten nur die Zellen die Selektion überleben, die sowohl den Vektor pEpi-K als auch den neu eingebrachten Vektor pEpi-HP enthalten. Für den Klon K2 wurden 40 und für den Klon K10 24 Einzelklone auf das Vorhandensein des episomal replizierenden Vektor pEpi-HP in der Southern Blot Analyse untersucht. In jedem der Klone konnte der episomal replizierende Vektor pEpi-K

nachgewiesen werden. Der Vektor pEpi-HP konnte jedoch sowohl im Southern Blot als auch in der PCR Analyse in einigen Klonen nur in Bruchstücken nachgewiesen werden, was auf eine Integration des Vektors in das Genom hinweist. Das Anlegen eines Co-Expressionssystems wie es hier durchgeführt wurde, schien demnach nicht möglich zu sein.

Auch das Anlegen episomal replizierender Einzelklone, die ausschließlich den Vektor mit der schweren Kette enthalten, war nicht möglich. Die Elektroporation des Vektors pEpi-HP in CHO-K1-Zellen und eine anschließende Selektion auf die Puromycinresistenz lieferte eine Anzahl von Klonen, für die nachgewiesen wurde, dass sie den Vektor stets in das Genom integrierten.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der Vektor pEpi-HP nicht über die bisherigen Standardverfahren zur Generierung einer diesen Vektor episomal replizierenden Zelllinie herangezogen werden kann. Dies kann in einer Instabilität dieses Vektors begründet sein, die mit dem Einbringen der Puromycinresistenz und damit des Austauschs eines nicht unerheblichen Teils des Vektorrückgrats entstanden sein kann. Diese eventuell vorhandene Instabilität kann vermehrt zu Einzelstrangbrüchen und somit zu einer Integration ins zelluläre Genom während der Elektroporation geführt haben. Aufgrund der Selektierbarkeit des Vektors pEpi-HP und der damit verbundenen möglichen Steuerung der Expression der schweren Kette über den Selektionsdruck sollte im Folgenden durch die Veränderung der Transfermethode in die Zelle die Häufigkeit der Integration des Vektors in das Genom verringert werden.

2.4.4. Etablierung eines Co-Expressionssystems mittels Lipofektion als Transfermethode der episomal replizierenden Vektoren

Da bislang die Methode der Elektroporation für das in dieser Arbeit vorgestellte Vektorsystem standardmäßig zur Erhaltung episomal replizierender Vektoren in CHO-K1-Zellen herangezogen wurde, es jedoch in mehr als 90 % der elektroporierten Zellen zu einer Integration des Vektors in das Genom kam, sollte in einem weiteren Ansatz die Generierung des Co-Expressionssystems über eine Lipofektion der entsprechenden Vektoren durchgeführt werden.

Dazu wurden CHO-K1-Zellen mit den beiden Vektoren pEpi-K und pEpi-HP, sowie in einem weiteren Ansatz mit pEpi-HP allein unter Standardbedingungen des ‚GenePorterTM2‘-Protokolls (s. Kapitel 4.10.6.1) transfiziert. Nach der Transfektion

wurden die Zellen vereinzelt und mit der Selektion auf die unterschiedlichen vorhandenen Resistenzen begonnen.

		pEpi-K	pEpi-HP	Selektion
1	CHO-K1 wt		+	Puromycin
2	CHO-K1 wt	+	+	G418
3	CHO-K1 wt	+	+	Puromycin + G418
4	Klon K2		+	Puromycin
5	Klon K2		+	Puromycin + G418

Tab. 2.4: Transfektionsschema zur Generierung episomal replizierender Vektoren im Co-Expressionssystem.

Die Bedingungen wurden hierbei so ausgewählt (s. Tab. 2.4), dass im Co-Expressionssystem zum einen ausschließlich auf das Vorhandensein des Vektors mit der leichten Kette und zum anderen auf beide vorliegenden Resistenzen selektiert wurde. Die Selektion auf den Vektor mit der schweren Kette allein erfolgte mit Puromycin. Analog wurde eine Lipofektion der Zellen des Einzelklons K2, welcher den Vektor pEpi-K stabil episomal repliziert (s. Kapitel 2.4.3) mit dem Vektor pEpi-HP durchgeführt. Auch hier fanden zwei verschiedene Selektionsbedingungen Verwendung. Dabei wurde auf die Vektoren mit der leichten und der schweren Kette simultan selektiert und in einem parallelen Ansatz ausschließlich auf die im pEpi-HP enthaltene Puromycinresistenz. Dadurch sollte ein erster Eindruck über die Möglichkeit der Manipulation des Co-Expressionssystems durch die Verwendung unterschiedlicher Selektionsbedingungen erhalten werden.

Die DNA der somit generierten Klongemische wurden auf den hier vorliegenden Status des Vektoren mittels Southern Blot Analyse überprüft.

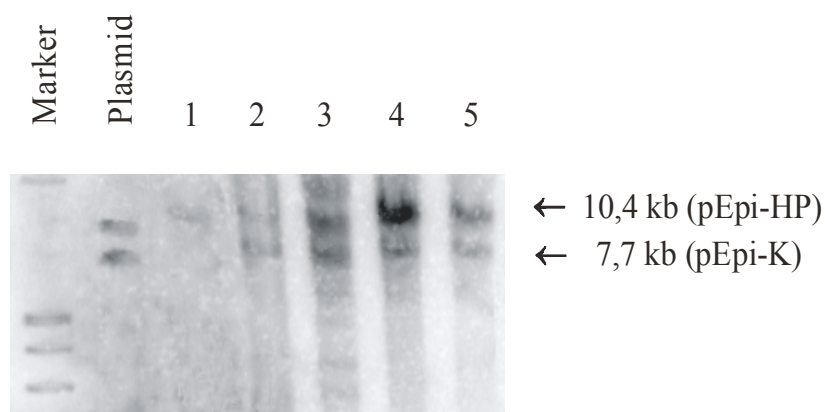


Abb. 2.26: Southern Blot Analyse der mittels Lipofektion generierten Klongemische.

Die Gesamt-DNA, der durch eine Transfektion nach dem ,GenePorter™ 2'- Standardprotokoll generierten stabilen Klongemische, wurde mit dem Restriktionsenzym BstZ17I geschnitten und mit einer SV40-Sonde hybridisiert. Die entstandene Bande bei einer Größe von 10,4 kb stellt den episomal replizierenden Vektor mit der schweren Kette (pEpi-HP) dar, die 7,7 kb-Bande repräsentiert den Vektor mit der leichten Kette (pEpi-K).

1: pEpi-HP, 2: pEpi-K + pEpi-HP (Selektion mit G418), 3: pEpi-K + pEpi-HP (Doppelselektion mit G418 und Puromycin), 4: episomal replizierender Klon K2 + pEpi-HP (Selektion mit Puromycin), 5: episomal replizierender Klon K2 + pEpi-HP (Selektion mit G418 und Puromycin). Plasmid: 1:1-Gemisch aus Plasmid-DNA der Vektoren pEpi-K und pEpi-HP, ebenfalls BstZ17I verdaut. Marker: λ HindIII/EcoRI, S³⁵ markiert.

Diese machte deutlich, dass durch die Transfermethode der Lipofektion für jeden der untersuchten Ansätze Banden in der Größe generiert werden konnten, die charakteristisch für das episomale Vorliegen der beiden Vektoren sind (s. Abb. 2.26). Nur für ein Klongemisch konnten schwache Zusatzbanden detektiert werden (Ansatz 3). Demnach konnten in nahezu allen der hier durchgeführten Lipofektionen Klongemische generiert werden, in denen zwei Vektoren simultan episomal replizieren. Zudem lieferte die Lipofektion des pEpi-HP ein Klongemisch, in welchem dieser Vektor episomal repliziert. Die Verwendung unterschiedlicher Selektionsbedingungen hatte in einem Klongemisch zur Folge, dass unter Verwendung von Puromycin als einziger Selektionsdroge eine Anreicherung des episomal replizierenden Vektors pEpi-HP gegenüber dem Vektor pEpi-K erzielt wurde, was durch die deutlich intensivere Bande in der Southern Blot Analyse (Ansatz 4) geschlossen werden konnte.

2.4.4.1. Expressionsanalyse der episomal replizierenden Antikörper-Vektoren in Klongemischen

Die Anlage einer Reihe von Kontrollvektoren sollte hier dem Expressionsvergleich zwischen episomal vorliegenden und stabil im Genom integrierten Vektoren dienen. Dazu wurde der Vektor pEpi-HK, der für beide Antikörperketten unter der jeweiligen Kontrolle des cmv-Promotors kodiert, mit dem Restriktionsenzym MfeI linearisiert (s. Abb. 2.22). Somit ist es möglich, die Expressionshöhe und -stabilität eines Gens im integrierten Zustand mit einem episomal replizierenden Vektor zu vergleichen. Das linearisierte Konstrukt wurde in CHO-K1-Zellen elektroporiert und mit G418 selektiert. Eine anschließende Southern Blot Analyse lieferte unter der Verwendung entsprechender Sonden für jeden Klon eine definierte Kopienzahl des integrierten Konstrukts (Daten nicht gezeigt). Die Vollständigkeit der integrierten Konstrukte wurde zudem durch eine PCR Analyse bestätigt. Als Kontrollklone für die Expressionsanalyse wurden zwei Klone

ausgewählt, die den Vektor pEpi-HK in einer Einzelkopie (IHK6) bzw. in zwei Kopien (IHK7) stabil integriert enthalten. Zur Expressionsanalyse wurde die Menge des sekretierten IgG-Moleküls der jeweiligen episomal replizierenden Vektoren der in Kapitel 2.4.4 vorgestellten Klongemische und der Kontrollklone mittels ELISA bestimmt (s. Abb. 2.27).

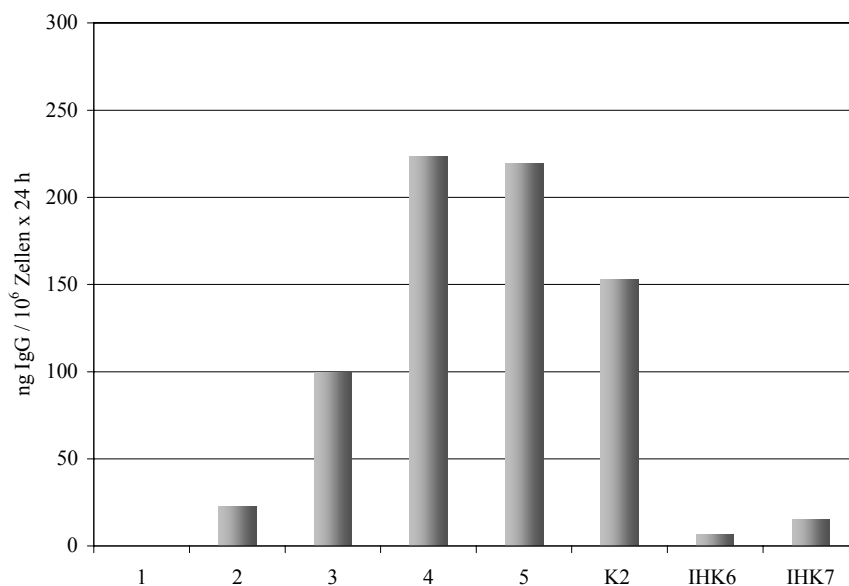


Abb. 2.27: Expressionsanalyse der durch Lipofektion generierten Klongemische und der Kontrollklone im ELISA.

Dargestellt ist die Menge sekretierten IgGs in ng pro Zellzahl und Zeit. Die hier gezeigten Mittelwerte stammen dabei jeweils aus drei unabhängigen Messungen der Zellüberstände nach 7 Passagen in Kultur. 1-5: Klongemische. 1: pEpi-HP, 2: pEpi-K + pEpi-HP (Selektion mit G418), 3: pEpi-K + pEpi-HP (Doppelselektion mit G418 und Puromycin), 4: episomal replizierender Klon K2 + pEpi-HP (Selektion mit Puromycin), 5: episomal replizierender Klon K2 + pEpi-HP (Selektion mit G418 und Puromycin). Kontrollklone s. Text.

Die Analyse der sekretierten Menge des IgGs zeigte Variationen zwischen den verschiedenen untersuchten Klongemischen. Für die Zellen, die den Vektor mit der schweren Kette allein enthalten, konnte erwartungsgemäß (s. Kapitel 2.4.1) auch hier keine Expression detektiert werden. Der simultane Transfer des Vektors mit der leichten und des Vektors mit der schweren Kette unter Selektion mit G418 ergab nur eine sehr geringe Menge von 22,4 ng IgG/10⁶ Zellen in 24 Stunden. Durch die Doppelselektion mit G418 und Puromycin konnte eine Erhöhung der Expression etwa um das Fünffache erreicht werden. Die Subklongemische des Klons K2, der bereits den episomal replizierenden Vektor mit der leichten Kette enthielt, die durch die Lipofektion mit dem Vektor pEpi-HP

generiert wurden, zeigten mit Mengen von 223,3 ng bzw. 219,2 ng IgG/10⁶ Zellen in 24 Stunden nochmals eine Expressionsverdopplung gegenüber dem simultanen Transfer. Die Expression des Klons K2 ohne den Vektor mit der schweren Kette lag bei 152,9 ng IgG/10⁶ Zellen in 24 Stunden. Die Generierung von Einzelklonen kann hierbei eine Erhöhung der Expression herbeiführen, da in einem Klongemisch der Anteil an Zellen, in denen der Vektor episomal oder auch in integrierter Form funktionell ist und nicht durch zelluläre Faktoren in der Expression des Transgens beeinflusst wird, unbestimmt ist. Die Generierung von Einzelklonen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt.

Die Kontrollklone, die den Vektor pEpi-HK stabil integriert enthielten und vergleichend zur Expressionsanalyse herangezogen wurden, zeigten beide eine sehr geringe Expression. Es konnte hiermit gezeigt werden, dass die Generierung eines Co-Expressionssystems, in dem zwei Vektoren simultan episomal in einer Zelle replizieren und auch exprimieren, durchführbar ist. Die Lipofektion als Transfermethode der Vektoren ist dabei optimal zur Vermeidung unspezifischer Integrationen der Vektoren in das zelluläre Genom. Das sequenzielle Einbringen der beiden Vektoren des Co-Expressionssystems ist für das Erreichen einer erhöhten Expression des Antikörpers geeignet. Durch die Verwendung unterschiedlicher Selektionen kann der Anteil eines Vektors in diesem System gezielt beeinflusst werden. Dies bietet die Möglichkeit, ein Gleichgewicht zwischen den beiden exprimierenden Antikörperketten über die Höhe des Selektionsdrucks einzustellen.

3. Diskussion

Für die Aufklärung biotechnologischer Fragestellungen, sowie für einen Einsatz in der Gentherapie, wird Fremd-DNA in eine Zelle eingebracht, die dort zu einer effizienten Expression der transferierten Gene führen soll. Eine Regulation der Genaktivität in den komplexen eukaryontischen Genomen, beispielsweise durch cis-agierende Elemente wie Enhancer, LCRs, Silencer, Isolatoren und auch S/MAR-Elemente, kann dabei vorteilhaft sein. Diese Elemente beeinflussen die Transkription des Gens durch Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren und DNA-modifizierenden Enzymen (Wilson et al., 1990).

Die zu untersuchenden DNA-Sequenzen können je nach Fragestellung unverpackt oder auch über virale Transfermethoden in das zelluläre Genom integriert werden bzw. extrachromosomal im Zellkern verbleiben. Die unspezifische Integration eines Sequenzabschnittes kann dabei zu einer Zerstörung des chromosomalen Leserasters führen oder auch zu einer positionsabhängigen Beeinflussung des Transgens durch das umgebende Chromatin (Bode et al., 2003). Auf replikationsdefizienten Retroviren basierende Vektoren bewirken die dauerhafte Expression eines Transgens, da diese in das Wirtsgenom, jedoch nur in sich teilende Zellen, stabil integrieren (Übersicht in Romano et al., 2000). Adenovirale Vektorsysteme integrieren in der Regel nicht in das zelluläre Wirtsgenom, sondern replizieren extrachromosomal. Dadurch kann eine hohe Expression eines Transgens erreicht werden, die jedoch transient, d.h. über einen kurzen Zeitraum stabil bleibt (Engelhardt et al., 1993). Der Einsatz von künstlich generierten Chromosomen (MACs) erwies sich für biotechnologische Fragestellungen durch ihre wenig definierte Struktur, ihre Instabilität, sowie durch ihre Größe im Megabasenpaarbereich, als wenig geeignet. Aufgrund ihrer geringen Größe, sowie ihrer episomalen Stabilität besitzen Vektoren auf Basis viraler Plasmidreplikons ein hohes Potential für Anwendungen in der Biotechnologie. Diese bestehen meistens aus dem jeweiligen viralen Replikationsursprung und dem transaktivierenden Protein, welches an den Ori binden kann und bewirken die Replikation des Vektors, sowie die gleichmäßige Verteilung auf die Tochterzellen bei der Mitose (Calos, 1998). Das hier vorgestellte Vektorsystem pEpi-1 basiert auf den Gegebenheiten eines solchen viralen Plasmidreplikons des Simian Virus 40. Das transaktivierende *Large T*-Antigen kann generell einen immunogenen Einfluss auf die Zielzelle haben (Chen et al., 1999) und auch zur Transformation führen (Cooper et al., 1997). Daher wurde anstelle des viralen transaktivierenden Proteins des SV40-Oris ein S/MAR-Element verwendet. Das S/MAR-Element ist in der Lage, die notwendigen Replikationsfaktoren, die Teil der Kernmatrix sind, zu rekrutieren. Die genauen Ursachen,

die diese Stabilität des episomal replizierenden Vektors ausmachen, konnten bislang noch nicht geklärt werden. Die Analysen der vorliegenden Arbeit geben Hinweise auf die Wirkungsweise der S/MAR-Sequenz in diesem Vektor und auf die Funktionalität von Replikationsursprüngen. Diese Erkenntnisse und die weiterführenden Untersuchungen im Hinblick auf die Optimierung der Stabilitäts- und Expressionseigenschaften des episomal replizierenden Vektorsystems werden im Folgenden diskutiert.

3.1. Eine aktive Transkription ist für den Erhalt des episomal replizierenden Vektors notwendig

Die episodale Stabilität muss in den funktionellen Elementen des hier vorgestellten Vektorsystems zu begründen sein. Hierfür kommen zunächst das S/MAR-Element, sowie der für eine stabile Replikation im eukaryontischen Genom eingebrachte SV40-Replikationsursprung in Frage. Replikationsursprünge sind häufig in der näheren Umgebung von S/MAR-Regionen lokalisiert (Amati und Gasser, 1990). Die Charakterisierung von eukaryontischen Oris zeigte, dass deren Sequenzeigenschaften zum Teil mit denen von S/MAR-Elementen übereinstimmen. S/MARs sind an der Organisation des Chromatins beteiligt und besitzen ein hohes Potenzial zur Strangtrennung (Bode et al., 1992). Diese Eigenschaften sollten bei der Entwicklung des neuartigen episomal replizierenden Vektorsystems pEpi-1 die Funktionen des bei viralen Plasmidreplikons notwendigen transaktivierenden Proteins (s. Kapitel 1.3) wie z. B. dessen Helikaseaktivität (Calos, 1998) ersetzen und die stabile Replikation und Segregation des Vektors ermöglichen. Erste Versuche an diesem Vektorsystem zeigten die Relevanz der Anordnung für die Wirkung der spezifischen Vektorelemente auf. Wird das auf dem Vektor befindliche eGFP-Gen durch eine 3'-Polyadenylierungsstelle terminiert, so kommt es stets zur Integration des Konstrukts in das zelluläre Genom. Daher wurde angenommen, dass die aktive Transkription oder auch die Transkriptionsrichtung in Bezug zu den funktionalen Elementen des Vektors eine wichtige Rolle zur Aufrechterhaltung des episodalen Status spielen.

3.1.1. Die Rekombinase-vermittelte Inversion der Transkriptionseinheit führt zum Verlust des episomal replizierenden Vektors durch Integration

Die Relevanz der Transkriptionsrichtung des eGFP-Gens im zirkulären Vektor pEpi-eGFP im Verhältnis zur Lage des SV40-Replikationsursprungs bzw. des S/MAR-Elements wurde in verschiedenen Versuchsansätzen bestimmt. Zum einen wurde ein Vektor generiert, bei dem die Transkriptionseinheit, bestehend aus cmv-Promotor und eGFP-Gen, invertiert wurde. Dieses Konstrukt lieferte in CHO-K1-Zellen Klone, für die mittels Southern Blot Analyse nachgewiesen wurde, dass in keinem Klon dieser Vektor episomal replizierte, d.h. es kam stets zur Integration in das zelluläre Genom.

Ein zusätzlicher Versuchsansatz, bei dem innerhalb eines charakterisierten, episomal replizierenden Vektors in der Zelle eine Inversion der Transkriptionseinheit durchgeführt wurde, gab weitere Auskunft über die Rolle der Transkriptionsrichtung in diesem Vektorsystem.

Für die Inversion in einem episomal replizierenden Vektor wurde ein Konstrukt verwendet, in dem die Transkriptionseinheit von zwei invers orientierten loxP-Sites flankiert vorliegt. Diese dienen als Erkennungsstellen für die Cre-Rekombinase, welche durch die Rekombinationsreaktion die Inversion der zwischen den loxP-Sites liegenden Sequenz hervorrufen (s. Abb. 2.6). Bei diesem Vorgang entsteht theoretisch ein 1:1 Gemisch beider möglicher Orientierungen der Transkriptionseinheit und es kann somit eine Untersuchung differentieller Eigenschaften beider Orientierungsisomere stattfinden. Die Inversionsreaktion wurde an einem episomal replizierenden Vektor in CHO-K1-Zellen durchgeführt und lieferte für 67 % der generierten Subklone eine Inversion der Transkriptionseinheit und ist demnach im episomalen Vektorsystem sehr effizient (s. Kapitel 2.2.2). Bei 27 % der Subklone lag die ursprüngliche Orientierung der Transkriptionseinheit weiterhin vor. Dies kann zum einen auf eine Mehrfachrekombination der Cre-Rekombinase zurückzuführen sein, da in jedem der Subklone eine transiente Selektion auf das Rekombinaseplasmid stattgefunden hat. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass die Rekombinase in diesen Subklonen nicht funktionell war. Zudem konnten nur in einem Subklon beide Orientierungen der Transkriptionseinheit nachgewiesen werden. Dies lieferte einen Hinweis auf die in dem Parentalklon vorliegende sehr geringe Anzahl von nur ein bis zwei Kopien des episomal replizierenden Vektors, da bei höherer Kopienzahl die Wahrscheinlichkeit der Generierung eines Gemisches aus beiden Orientierungen wesentlich größer gewesen wäre. Dieser Subklon, der beide Orientierungen der Transkriptionseinheit aufwies, wurde mittels FACS-Sortierung in zwei Populationen

aufgeteilt. Dabei wurden die exprimierenden von den nicht-exprimierenden Zellen getrennt kultiviert und auf die Verteilung der Orientierung der Transkriptionseinheit untersucht (s. Kapitel 2.2.2.3). Dabei stellte sich heraus, dass in der Population der exprimierenden Zellen eine Anreicherung der ursprünglichen Orientierung stattgefunden hat, wohingegen bei den nicht-exprimierenden Zellen beide Orientierungen in gleichen Anteilen vorlagen. Dies bestätigte die Notwendigkeit der Transkription in Richtung des S/MAR-Elements für eine stabile Transkription bzw. Expression.

Die Inversion der Transkriptionseinheit führte in 100 % der generierten Subklone zur Integration des Vektors in das zelluläre Genom, sowie zum vollständigen Expressionsverlust (s. Kapitel 2.2.2.2). Dabei konnte durch verschiedene Analysen nachgewiesen werden, dass in jedem dieser Klone bestimmte Anteile des Vektors, wie das *neo^r*-Gen, das S/MAR-Element und der *cmv*-Promotor, integriert wurden. Allerdings schien ein Bruch im Bereich des eGFP-Gens und der 3' davon befindlichen loxP-Site stattgefunden zu haben. Dies könnte durch einen spezifischen Strangbruch des Vektors im Bereich des eGFP-Gens erklärt werden, der als Folge der Inversionsreaktion stattgefunden haben könnte, da hierbei die DNA-Stränge geschnitten und anschließend neu verknüpft werden. Eine weitere Erklärung der spezifischen Integration des Vektors an dieser Stelle kann durch die fehlende Transkription des eGFP-Gens gegeben werden, da infolge der Deletion des Polyadenylierungssignals und der fehlenden Transkription in Richtung des S/MAR-Elements, der Vektor nicht mehr in der Lage war, episomal zu replizieren. Alles in allem zeigt sich, dass die Transkriptionsrichtung essentiell für die Aufrechterhaltung des episomalen Status eines Vektors in der Zelle ist.

3.1.2. Termination der Transkription im S/MAR-Element

Der Erhalt des episomal replizierenden Vektors pEpi-1 bzw. dessen Derivate beruht auf dem Zusammenspiel funktionaler Elemente, die in einer spezifischen Anordnung zueinander auf dem Plasmid vorliegen. So wurde von Piechaczek et al., 1999 zunächst aus klonierungstechnischen Gründen die Transkriptionseinheit, bestehend aus *cmv*-Promotor, eGFP-Gen und dem daran anschließenden SV40-Polyadenylierungssignal, von einem S/MAR-Element an dieser Stelle unterbrochen. Wie sich später herausstellte, ermöglicht ausschließlich diese Anordnung eine stabile episomale Replikation des Vektors. Das Einbringen eines Polyadenylierungssignals zwischen eGFP-Gen und S/MAR-Element führte stets zur Integration des Vektors in das zelluläre Genom. Dies gab einen ersten Hinweis darauf, dass eine aktive Transkription des eGFP-Gens bis in das S/MAR-Element

ablaufen muss, um einen episomalen Status zu gewährleisten. Durch eine Northern Blot Analyse, bei der die gesamte mRNA von CHO-K1-Zellen verwendet wurde, die das Konstrukt pEpi-L1CGΔpA1L episomal enthalten, konnte gezeigt werden, dass die Transkription des eGFP-Gens an mindestens einer Stelle im S/MAR-Element terminiert wird (s. Kapitel 2.2.1). Der AT-Reichtum des S/MAR-Elements liefert mehrere Anlaufstellen für die RNA-Polymerase zur Termination der Transkription. Es konnten daher kryptische Polyadenylierungssignale bei 450 bp und 700 bp mittels Sequenzanalyse und Northern Blot bestimmt werden. Von einem Kooperationspartner konnten diese Ergebnisse bestätigt (mündliche Mitteilung) und außerdem gezeigt werden, dass eine Termination auch nach 1600 bp im S/MAR-Element stattfindet (Stehle et al., 2003). Hier wurden zudem verschiedene Deletionen von bestimmten Vektoranteilen durchgeführt. Dabei lieferte das Entfernen des cmv-Promotors und in einem weiteren Ansatz die Deletion des eGFP-Gens jeweils keinen episomal replizierenden Vektor in CHO-K1-Zellen. Es kam stets zur Integration des Konstrukts in das zelluläre Genom. Dadurch wurde bestätigt, dass nur eine funktionelle aktive Transkription den episomalen Status in der Zelle aufrechterhalten kann.

3.1.3. Die stabile Replikation wird durch die transkriptionsabhängige Modifikation der Chromatinstruktur erreicht

Die gezeigten Resultate stellen die Notwendigkeit der aktiven Transkription in eine definierte Richtung zur Generierung episomal replizierender Vektoren dar. Dabei ist es essenziell, dass eine Transkription über das Gen hinaus in das S/MAR-Element stattfindet, wo sie an unterschiedlichen Stellen terminiert werden kann. Diese Veränderung der DNA-Struktur im Bereich der S/MAR-Sequenz kann zu einer Modifikation der Konformation des Vektors führen (Mielke et al., 1990; Bode et al., 1998). Eine Veränderung der Chromatinstruktur kann wiederum die Zugänglichkeit für Proteine der Replikationsmaschinerie erleichtern, da es durch die positive Superhelizität der DNA zu einem Verlust der Nukleosomenbindung kommt (Clark und Felsenfeld, 1991).

Die Replikation der chromosomalen DNA in eukaryontischen Zellen ist strikt koordiniert und läuft nur einmal pro Zellzyklus ab. Dabei kommt es zur Anlagerung verschiedener Replikationsinitiationsproteine an spezifische DNA-Bereiche (s. Kapitel 1.2). Diese als Replikationsursprung bezeichneten Sequenzen besitzen außer ihrem AT-Reichtum keine Konsensussequenzen (Übersicht in DePamphilis, 1999). Zudem führte der Transfer eines authentischen Oris an eine andere Stelle in demselben Nukleus nicht zur

Replikationsinitiation (Altman und Fanning, 2001; Liu et al., 2003). Daher scheinen die Startstellen der Replikation weniger von der vorliegenden DNA-Sequenz als vielmehr von epigenetischen Faktoren, wie spezifisch gebundenen Transkriptionsfaktoren oder auch der Chromatinkonformation bestimmt zu sein (Übersicht in Méchali, 2001). Bislang konnte für Plasmide, die einen authentischen Replikationsursprung enthalten, im Vergleich zu Plasmiden ohne Ori-Sequenzen ein Replikationsvorteil nur im transienten Zustand in der Zelle gezeigt werden (McWhinney und Leffak, 1990). Von Price et al. (2003) wurde eine 36 bp-Sequenz beschrieben, die für die kurzzeitige Replikation einer vektoriellen DNA in der Zelle erforderlich zu sein scheint. Diese 36 bp-Sequenz ist sechsmal (jedoch mit drei „*mismatches*“) im Konstrukt pEpi-1 zu finden und könnte für die stabile Replikation mitverantwortlich sein.

Es wurde zudem gezeigt, dass einige Mitglieder des Prä-Replikations-Komplexes an den Vektor pEpi-1 binden. Daher konnte diesen Proteinen eine funktionelle Rolle bei der Replikation des episomal replizierenden Vektors zugeschrieben werden (Schaarschmidt et al., 2003). Diese Bindungsstellen sind dabei über den gesamten Vektor verteilt. Es konnte gezeigt werden, dass die ORC-Bindung und somit die Replikationsinitiation nicht sequenzspezifisch sind. Von einem Kooperationspartner (Lipps et al., unveröffentlicht) konnte kürzlich gezeigt werden, dass auch die Deletion der SV40-Ori-Sequenz im Vektor pEpi-1 die stabile Replikation nicht beeinträchtigt. Der SV40-Ori des pEpi-1 spielt demnach für die Replikation des episomalen Vektors keine Rolle.

In früheren Arbeiten (Baiker et al., 2000) wurde dargestellt, dass der Vektor pEpi-1 mit mitotischen Chromosomen assoziiert im Zellkern vorliegt. Diese Assoziation wird durch das Kernmatrix bindende Protein SAF-A vermittelt, welches eine hohe Affinität zur S/MAR-Sequenz des Vektors pEpi-1 aufweist (Jenke et al., 2002). Durch die Bindung des Vektors an die Kernmatrix werden die durch die Replikation entstandenen Vektoren nach der Mitose gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. Der Ablauf der Segregation ist hier demnach bestimmt vom Vorhandensein des S/MAR-Elements.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die aktive Transkription in Richtung des S/MAR-Elements und die damit verbundene Konformationsänderung der Vektorsequenz nach den bisherigen Erkenntnissen für die stabile Replikation des episomal replizierenden Vektors ausreichend ist. Die zugrunde liegende Sequenz eines Vektors ist zur Bindung der funktionalen Proteine nicht allein ausreichend, sondern vielmehr deren Chromatinkonformation, welche durch die aktive Transkription dahingehend verändert wird, dass eine ORC-Bindung zustande kommen kann. Die Initiation der Replikation ist nicht sequenzspezifisch und findet daher nicht charakteristisch im Bereich des SV40-Oris statt, wodurch dessen Relevanz für die episodale Stabilität des Vektors durch das S/MAR-Element aufgehoben wird.

3.2. Die effiziente Generierung eines episomal replizierenden Vektorsystems ist abhängig von der Methode des DNA-Transfers

Zur Generierung eines stabil episomal replizierenden Vektors wurde bisher standardmäßig eine Elektroporation der Plasmid-DNA in die Zelle durchgeführt (Piechaczek et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit lag die Effizienz für eine Etablierung eines Episoms durch Elektroporation bei weniger als 10 %. Die weiteren analysierten Klone zeigten stets eine Integration des Vektors in das zelluläre Genom. Plasmid-DNA, die über eine Anionenaustauscher-Säule basierend auf SiO_2 (s. Kapitel 4.5.2) aufgereinigt wurde, lieferte nur in 2,5 % der Zellen einen episomal replizierenden Vektor. Die Erhöhung der Effizienz auf 9,1 % konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Verwendung von Plasmid-DNA erreicht werden, welche mittels eines Cäsiumchlorid-Gradienten präpariert wurde (s. Kapitel 4.5.3). Dies ist auf die Integrität der DNA nach der Isolierung aus Bakterien zurückzuführen. Es konnte gezeigt werden, dass in Plasmiden stets ein gewisser Anteil an linearisierter DNA bzw. DNA mit Einzelstrangbrüchen, vorliegt. Die Menge an DNA, die in einer geschlossenen „*supercoiled*“-Struktur vorliegt, ist dabei abhängig von der Präparationsmethode (s. Abb. 4.1) und nach CsCl -Aufreinigung größer als nach Säulen-Aufreinigung. Unabhängig von der verwendeten Präparationsmethode führt der vorliegende Anteil an Einzelstrangbrüchen in der Plasmid-DNA während des Elektroporationsvorgangs jedoch offensichtlich bevorzugt zu einer unspezifischen Integration des Vektors in das zelluläre Genom (s. Kapitel 2.1).

Bei der Elektroporation wird die Zellmembran reversibel permeabilisiert, wodurch Fremd-DNA in die Zelle eindringen und über einen Konzentrationsgradienten transportiert werden kann (Wong et al., 1982). *In vivo* kann DNA über eine Elektroporation in verschiedenste Gewebetypen, wie Haut (Titomirov et al., 1991), Muskel (Aihara und Miyazaki, 1998) und Melanomazellen (Rols et al., 1998) eingebracht und exprimiert werden. Die Elektroporation führt zudem zu einer weiten Verteilung transfizierter Zellen innerhalb eines Gewebes durch eine Diffusion der Plasmid-DNA durch den extrazellulären Raum (Übersicht in Nishikawa und Huang, 2001). Der mechanische Stress, der bei dem Elektroporationsvorgang auf die Zelle einwirkt (Vernhes et al., 1999), scheint jedoch für die Etablierung eines Episoms in einer Wirtszelle auch einen gravierenden Einfluss auf die zu transfizierende zirkuläre DNA zu haben. Dabei kommt es offensichtlich vermehrt zum Einzel- oder auch Doppelstrangbruch und somit zur Integration der nunmehr linear vorliegenden DNA, wodurch der hier gezeigte geringe Anteil episomal replizierender Vektoren nach der Elektroporation zu erklären ist.

In der vorliegenden Arbeit fand daher zusätzlich eine weitere DNA-Transfermethode Verwendung. Die Verpackung der Plasmid-DNA durch Liposomen sollte den bei der Elektroporation auftretenden Stress für die Zelle und für die zu transfizierende DNA minimieren. Bei dem Vorgang der Lipofektion (s. Kapitel 4.10.6.1) werden zunächst positiv geladene Komplexe aus kationischen Lipiden und der zu transfizierenden DNA gebildet. Aufgrund der Interaktion dieser Komplexe mit der negativ geladenen äußeren Zellmembran kommt es zur Endozytose. Die Freisetzung der DNA im Zellkern erfolgt durch eine Abschwächung der Lipid-DNA-Wechselwirkung nach der Diffusion anionischer Lipide aus der Zellmembran in den Komplex. Die Verwendung kationischer Lipid-DNA-Komplexe führte bislang erfolgreich zur *in vivo* Transfektion der Lunge (Brigham et al., 1989), des Gehirns (Ono et al., 1990), sowie von Tumor- (Plautz et al., 1993) und Hautzellen (Raz et al., 1994). Aufgrund des geringeren mechanischen Stresses für die transfizierte Zelle wird durch eine Lipofektion der DNA die Integration des episomal replizierenden Vektors weitestgehend verhindert.

3.3. Der Einfluss der Transgenexpression auf die Replikation

Die Generierung eines episomal replizierenden Vektorsystems wurde in der vorliegenden Arbeit auf unterschiedliche Arten durchgeführt. Dabei wurde der Vektor pEpi-1 bzw. dessen verschiedene Derivate entweder über eine Elektroporation oder über eine Lipofektion in die Zellen eingebracht. Zudem wurde die Exzision eines zirkulären Vektors aus einem im Genom integrierten Sequenzabschnitt durchgeführt. Die zum Teil erheblichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Etablierungsmethoden bezüglich ihrer Expression in Abhängigkeit des Selektionsdrucks und die damit verbundenen Unterschiede in der Replikationsstabilität werden im Folgenden diskutiert.

3.3.1. Die Expression des episomal replizierenden Vektors im Vergleich zu stabil integrierten Vektoren

Bei dem Transfer von Fremdgenen unter Zellkulturbedingungen dient der anzulegende Selektionsdruck der Stabilität der Transgenexpression im zellulären Zielgenom (Mielke et al., 2000). Auch für das hier vorgestellte episomal replizierende Vektorsystem wurde gezeigt, dass die Selektion für die Etablierung des Episoms, d.h. für die Generierung

einzelner Klone nach einer Elektroporation des Vektors in die Zelle, notwendig ist. Der Vektor wird nach der Etablierungsphase auch ohne Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks stabil episomal repliziert, wobei jedoch erhebliche selektionsbedingte Einflüsse auf die Expression des Transgens verbleiben.

Zur Überprüfung der Wirkung des S/MAR-Elements auf die Expression des hier verwendeten Vektorsystems wurde im Vektor pEpi-eGFP eine Deletion des S/MAR-Elements durchgeführt und dieser anschließend stabil in das Genom integriert. Dabei verringerte sich die Expression unabhängig vom Selektionsdruck auf einen Wert, der weit unterhalb der Expression des Vektors, der das S/MAR-Element enthält und stabil in das Genom integriert wurde, lag. Das S/MAR-Element hat somit eine steigernde und vor allem stabilisierende Wirkung auf die Expression des benachbarten Transgens im integrierten Zustand in dem hier verwendeten Vektorsystem. Dies bestätigte frühere Erkenntnisse über die S/MAR-Aktivität, die besagen, dass ein transkriptionsfördernder Effekt im stabil integrierten Zustand eines Vektors vermittelt wird (Klehr et al., 1991; Bode et al., 2000a). S/MAR-Elemente besitzen, besonders in Form einer Minidomäne, in der ein Transgen von zwei S/MAR-Elementen flankiert wird, eine Isolator-ähnliche Funktion, wobei das integrierte Transgen von endogenen cis-agierenden Elementen, wie Silencern oder auch Enhancern und LCRs, abgeschirmt wird (Baer, 2002).

Im Laufe dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass der episomale Status eines Vektors unabhängig vom Selektionsdruck über mindestens 30 Passagen in Kultur erhalten bleibt. Insgesamt wurde für episomal replizierende Vektoren, die mittels Elektroporation in CHO-K1-Zellen eingebracht wurden, stets in einem geringeren Anteil der Zellen eines Klons eine Expression festgestellt, als für den gleichen Vektor, der stabil in dem Genom der Zelle integriert vorlag (s. Kapitel 2.1.1). Dabei ist die Expression des integrierten Vektors nahezu unabhängig vom Selektionsdruck.

Die geringe Expression episomal replizierender Vektoren, welche mit der stabilen Replikation einhergeht, könnte an dieser Stelle mit der Konkurrenz zellulärer Faktoren zusammenhängen. Sowohl die Initiation der Transkription als auch der Replikation erfordern eine Polymerasebindung und -wanderung entlang spezifischer Sequenzen des Vektors. Dass eine aktive Transkription die Replikationsrate eines autonom replizierenden Vektors verringert, konnte an einem EBV-basierenden System gezeigt werden (Haase et al., 1994). Umgekehrt könnte in dem hier vorliegenden System die geringe Expression durch die hohe Replikationsrate resultieren.

Der für die Elektroporation verwendete Vektor (pEpi-L1CG Δ pA1L) enthält mit der cmv-Promotor/eGFP-Gen-Kassette und dem Selektionsmarker zwei verschiedene Transkriptionseinheiten. Wird die zweite Transkriptionseinheit mit dem Selektionsmarker, wie in Kapitel 2.3.2 dargestellt, deletiert, und das eGFP-Gen unter die Kontrolle des SV40-

Promotors gestellt, so kann sowohl eine hohe Expression als auch eine hohe Stabilität der Replikation des episomalen Vektors erzielt werden. Dies kann im Zusammenhang mit den bereits diskutierten Daten bedeuten, dass die Transkriptionsfaktoren bei der Transkription einer einzigen Expressionseinheit nicht mit der Replikationsinitiation konkurrieren und beide Prozesse parallel ablaufen können. Die Optimierung der Anordnung der vektoriellen Sequenzen und die daraus resultierenden Konsequenzen für das episomal replizierende Vektorsystem werden weiterführend in Kapitel 3.4 diskutiert.

3.3.2. Die Expression in Abhängigkeit des Selektionsdrucks

Bei einem Vektor, der nach der Elektroporation in einer Zelle episomal repliziert, kann eine Entfernung des Selektionsdrucks zur Folge haben, dass es zu einer starken Verringerung des Anteils exprimierender Zellen innerhalb eines Klons kommt (s. Kapitel 2.1.1 und 2.2.2.2). Der episomale Status bleibt dabei auch ohne Selektionsdruck erhalten. Ein analoger Effekt konnte für ein episomales Shuttle-Vektorsystem in humanen Fibroblastenzellen nachgewiesen werden, wobei dort eine Reaktivierung der Expression nach erneut beginnender Selektion festgestellt wurde (Wade-Martins et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit kam es auch bei stets gleich bleibendem Selektionsdruck zu einer leichten Absenkung des Anteils exprimierender Zellen nach längerer Kultivierungsdauer (s. Abb. 2.10, A). Der Rückgang der Expression ist auf eine Inaktivierung der Vektorsequenzen durch zelluläre Histon-Deacetylasen und die damit einhergehende DNA-Methylierung zurückzuführen (Pikaart et al., 1998; Mielke et al., 2000), da durch eine Inkubation dieser Zellen mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor Butyrat eine teilweise Reaktivierung der Expression erreicht werden konnte. Hierfür spricht zudem die Tatsache, dass der episomale Vektor auch nach der Expressionsverringerung detektierbar blieb.

An einem Beispiel konnte gezeigt werden, dass der Selektionsdruck zu einer erheblichen Expressionssteigerung führen kann (s. Abb. 2.10, C). Im Laufe des Kultivierungszeitraums erhöhte sich der Anteil exprimierender Zellen in einem Klon von 2,5 auf 57 %. Wurde der Selektionsdruck nach einem Kultivierungszeitraum von 23 Passagen entfernt, so blieb der Anteil bei 3 bis 6 %. Die Erhöhung stand somit in direkter Relation zum Selektionsdruck. Der Anstieg des Anteils exprimierender Zellen erfolgte erst nach etwa 20 Passagen in Kultur. Dies lieferte einen Hinweis auf die optimale Dauer des Selektionsdrucks zur Expressionserhöhung innerhalb eines Klons. Je länger die Etablierungsphase eines Episoms unter Selektionsdruck andauert, desto höher scheint die resultierende Expression.

Insgesamt kann somit die Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks nach einer Elektroporation und die folgende Generierung einzelner Klone für die anschließende Expression eines Transgens im Episom unterschiedliche Effekte zeigen. Dabei kann der Selektionsdruck zu einer Steigerung oder zu einer Abschwächung der Expression führen. Der episomale Zustand bleibt unabhängig vom Selektionsdruck stets stabil.

Um eine Verbesserung dieser aufgetretenen differentiellen Eigenschaften der episomal replizierenden Vektoren nach der Etablierung durch eine Elektroporation zu erreichen, wurde ein völlig neues Konzept entwickelt. Durch eine FLP-vermittelte Rekombination wurde ein im Genom integriertes Konstrukt exzidiert, was zu dessen stabiler Replikation und Expression in der Zelle führte. In Kapitel 2.3.2.6 konnte anhand dieser exzidierten Vektorsequenzen gezeigt werden, dass episomale Vektoren, bei denen eine Deletion großer Anteile prokaryontischer Sequenzen durchgeführt wurde, unabhängig vom Selektionsdruck eine sehr hohe und stabile Expression aufwiesen. Das hierbei entstandene Minmalepisom benötigte zur Aufrechterhaltung der Episomalität und auch der Expression über mindestens 15 Passagen in Kultur keinen Selektionsdruck. Es konnte gezeigt werden, dass die Langzeitstabilität der Expression eines Episoms nach der Exzision völlig unabhängig vom Selektionsdruck gegeben ist. Somit wurde bestätigt, dass nur bei der Etablierung eines episomal replizierenden Vektors durch die Elektroporation eines zirkulären Plasmids eine Selektion notwendig ist. Dies kann durch die vektoriellen prokaryontischen Sequenzen begründet sein, da diese durch ihren hohen GC-Gehalt epigenetische Inaktivierungsprozesse wie z. B. Methylierungen hervorrufen, wodurch eine Inhibition der Transgenexpression stattfinden kann (Übersicht in Bestor, 1990). Diese Sequenzen verbleiben beim hier vorgestellten Konzept der Exzision eines Episoms aus einem integrierten Konstrukt im Genom und haben somit keinen Einfluss auf die Transgenexpression des episomalen Vektors.

Eine vom Selektionsdruck unabhängige Expression eines Transgens konnte für einen weiteren in dieser Arbeit durchgeführten Versuchsansatz gezeigt werden. In Kapitel 2.4.4 wird dargestellt, dass die Entwicklung eines Co-Expressionssystems, bei dem zwei Vektoren simultan episomal in CHO-K1-Zellen repliziert werden, durch einen DNA-Transfer mittels kationischer Lipid-DNA-Komplexe möglich ist. Nach dem DNA-Transfer wurde bei den Zellen ein stetiger Selektionsdruck angelegt, welcher abhängig von der auf den Vektoren befindlichen Resistenz unterschiedlich war. Hierbei hatte der Selektionsdruck keinen Einfluss auf die Generierung des Co-Expressionssystems (s. Kapitel 3.5.2). Dieser kann daher zur Harmonisierung der Kopienzahl bzw. der Expression, der im Co-Expressionssystem vorhandenen Gene beitragen. Im hier vorgestellten System wurden im Rahmen dieser Arbeit bisher keine Langzeitversuche durchgeführt. Ob ein länger andauernder Selektionsdruck einen positiven oder auch

negativen Einfluss auf die Expression zeigt, wie es nach der Elektroporation dargestellt wurde, kann demnach nicht abschließend geklärt werden. Die bisherigen Erkenntnisse lassen den Schluss zu, dass die Notwendigkeit der Selektion offensichtlich abhängig von der Gentransfermethode ist und nur nach der Elektroporation, nicht aber nach der Lipofektion die Expressionsstabilität der Vektoren beeinflusst.

3.4. Die Rekombinase-vermittelte Exzision spezifischer Vektorsequenzen aus dem Genom führt effizient zur Generierung episomal replizierender Vektoren

Die Etablierung einer Rekombinase-vermittelten Exzision eines Episoms aus einem stabil im Genom integrierten Vektor bietet die Möglichkeit der Verbesserung des bisher verwendeten episomalen Vektorsystems. Das Minimalepisom kann mit einer definierten Kopienzahl aus dem Genom exzidiert werden. Die Stabilität der Kopienzahl im Verlauf weiterer Replikationszyklen kann somit verfolgt und analysiert werden. Dadurch werden Interpretationsprobleme, wie sie bei der transienten oder auch stabilen Transfektion von mehreren Kopien eines Vektors in der Zelle, von denen nicht alle transkriptionell aktiv sein müssen, vermieden. Zudem können bei geschickter Anordnung der Rekombinase-Erkennungsstellen prokaryontische Vektoranteile und Selektionsmarker aus dem episomal replizierenden Konstrukt weitestgehend entfernt werden. Prokaryontische Sequenzen können aufgrund ihres hohen statistischen Auftretens von CpG-Abschnitten einen negativen Einfluss in Form von Methylierungs- und Inaktivierungsprozessen auslösen (Mutskov und Felsenfeld, 2003). Deren Eliminierung erfolgt daher im Sinne einer verbesserten Funktion des Minimalepisoms für biotechnologische und auch gentherapeutische Fragestellungen. Die Feststellung der minimalen Größe, die zur Aufrechterhaltung des episomalen Zustands notwendig ist, bietet eine Grundlage für die Bestimmung der Klonierungs- bzw. Größenskapazität des Vektors.

Die Rekombinase-vermittelte Exzision wurde von Parnell und Geyer (2000) erfolgreich zur Generierung episomal replizierender Vektoren in *Drosophila* angewendet. Dabei wurden Episomen in post-mitotischen Zellen etabliert. Diese exzidierten Vektoren dienten der Analyse der Isolatorfunktion der *gypsy*- bzw. *scs*-Isolatorelemente im extra-chromosomalen Umfeld. Ein analoges System wurde in der vorliegenden Arbeit durch das mitotisch stabile Vektorsystem pEpi-1 auch in Mammaliazellen etabliert.

Zur Exzision eines Minimalepisoms (s. Abb. 2.13) wurden in den Vektor pEpi-eGFP zwei gleichgerichtete FRT-Sites eingebracht, die der FLP-Rekombinase als Erkennungsstelle

dienen. Die zwischen den FRT-Sites liegende Sequenz besteht aus dem eGFP-Gen, dem S/MAR-Element und dem SV40-Replikationsursprung und -Promotor. Dieser Vektor wurde linearisiert und stabil mit definierten Kopienzahlen in das zelluläre Genom von CHO-K1-Zellen integriert. Nach einer transienten Expression der Flp-Rekombinase resultiert durch intramolekulare Rekombination ein replizierendes Minimalepisom. Dieses besteht aus dem eGFP-Gen, welches als Folge der Rezirkularisierung unter der Kontrolle des SV40-Promotors steht, dem S/MAR-Element und dem SV40-Ori. Der prokaryontische Anteil des Vektors und auch der Selektionsmarker verbleiben dabei im Genom.

Die Etablierung der Minimalepisomen wurde hierbei über verschiedene Exzisions- und Anreicherungsstrategien durchgeführt. Die Analyse dieser verschiedenen Strategien ermöglicht eine Ausdehnung des Anwendungsbereiches episomal replizierender Vektorsysteme. So können Rekombinasen beispielsweise auch an bereits etablierten Episomen zur gezielten Deletion, Inversion oder Translokation von Sequenzabschnitten Verwendung finden (s. Kapitel 3.6).

3.4.1. Vergleich der Selektionsstrategien

Für die Exzisionsreaktion wurde die thermostabile Variante Flpe (Flp „*enhanced*“) der Flp-Rekombinase verwendet (Buchholz et al., 1998), für die die zwei Vektoren pFlpe und pFRFus zur Verfügung standen. Das Konstrukt pFlpe enthält die Flp-Rekombinase und das Puromycin-Resistenzgen, welche durch ein IRES-Element gekoppelt sind. Dadurch besteht die Möglichkeit, im vorliegenden System eine transiente Selektion auf das Rekombinaseprotein durch die Puromycinresistenz vorzunehmen. Das zweite verwendete Konstrukt enthält ein Fusionsgen aus dem „Rot Fluoreszierenden Protein“ (RFP)-Gen und dem Flpe-Gen unter der Kontrolle des cmv Promotor/Enhancers. Das RFP-Gen liefert dabei die Möglichkeit, die Zellen, die das Rekombinaseplasmid nach einer Transfektion enthalten, durch eine FACS-Sortierung von nicht-transfizierten Zellen zu trennen. Durch die Fusion der beiden Gene wird in den so erhaltenen Zellen die Flp-Rekombinase exprimiert. Beide Rekombinasevektoren wurden für die Exzisionsreaktionen verwendet und ihre Funktionalität und Effizienz bestimmt und bewertet.

Nach der Charakterisierung des in CHO-K1-Zellen stabil integrierten Vektors pEpi-FGSARF wurde ein Klon zur vergleichenden Transfektion mit den beiden Rekombinaseplasmiden herangezogen (s. Kapitel 2.3.2.4 und 2.3.2.5). Die transiente Expression der Flp-Rekombinase des Vektors pFRFus und eine anschließende Sortierung auf RFP-exprimierende Zellen lieferte in 12,3 % der somit generierten Subklone eine

spezifische und vollständige Exzision des zwischen den FRT-Sites befindlichen Vektoranteils. Für 20 % der Subklone konnte ein Mischzustand aus exzisiertem und verbleibendem integrierten Vektor detektiert werden. In den restlichen 67,7 % hat keine Exzisionsreaktion stattgefunden. Die transiente Expression der FLP-Rekombinase des Vektors pFLpe und die damit verbundene Selektion auf die Puromycinresistenz führte in nur 3,6 % der hierbei generierten Subklone zu einer Exzision des Vektors. Jedoch war der Anteil der Subklone, in denen ein Mischzustand aus noch integriertem und exzisiertem Vektor vorlag mit 42,8 % mehr als doppelt so hoch wie für das pFRFus-Selektionssystem. Daher war der Anteil an nicht-exzisierten Subklonen hier mit 53,6 % etwas geringer.

Der Anteil an exzisierten Subklonen liegt somit nach pFRFus-Transfektion signifikant höher als nach pFLpe-Transfektion. Dies betrifft auch den Mischzustand von exzisiertem und zusätzlich integriert vorliegendem Vektor.

Insgesamt ist das Selektionssystem, bei dem die transiente Expression einer Fusion aus RFP und FLP-Rekombinase und die anschließende Sortierung auf fluoreszierende Einzelzellen durchgeführt wird, der Methode der transienten Puromycinselektion auf das Rekombinaseplasmid pFLpe aufgrund der etwa viermal höheren Effizienz für das vorliegende Exzisionskonzept vorzuziehen.

3.4.2. Exzisionsstrategien zur Generierung von Minimalepisomen

Für die Exzision eines definierten Sequenzabschnitts aus einem stabil im zellulären Genom integrierten Konstrukt wurde zunächst der vollständige, aber linearisierte Vektor in einer definierten Kopienzahl über eine Elektroporation in CHO-K1-Zellen eingebracht, wodurch bevorzugt singuläre Kopien eines Vektors integrieren (Baer et al., 2000). Nach der Exzisionsreaktion durch die FLP-vermittelte Rekombination steht das eGFP-Gen durch die Zirkularisierung des exzisierten Vektoranteils fortan unter der Kontrolle des SV40-Promotors. Im Genom verbleiben dabei der cmv-Promotor und der Selektionsmarker *kana^r/neo^r*. Dadurch kann die Selektion in diesen Zellen prinzipiell aufrechterhalten werden.

Die Exzisionsreaktion mit dem bereits beschriebenen Selektionssystemen des Rekombinaseplasids pFRFus (s. Kapitel 3.4.1) resultierte in 24 % der untersuchten Einzelkopie-Subklone in einer Exzision des spezifischen Vektoranteils. Exzisierte Vektoranteile konnten allerdings für keinen der Klone nachgewiesen werden. Die Selektion auf den im Genom verbleibenden Vektoranteil mittels G418 wurde zum Teil aufrechterhalten. Diese Selektion könnte einen negativen Einfluss auf die generierten

exzisierten Minimalepisomen ausgeübt und deren Abbau in der Zelle zur Folge gehabt haben.

In einem weiterführenden Ansatz wurde daher auf die Selektion mit G418 verzichtet. Stattdessen wurde eine Selektion auf die Generierung des Minimalepisoms über die Expression des eGFP-Gens durchgeführt. Dazu fand ein so genanntes „*Promotor-Trap*“-Verfahren Verwendung. Der Vektor pEpi-FGSARF wird dabei analog zu dem oben beschriebenen Ansatz linearisiert, jedoch wird der cmv-Promotor bei der Linearisierung deletiert, so dass das daran anschließende eGFP-Gen im integrierten Zustand nicht exprimiert werden kann. Nach Flp-vermittelter Rekombination kommt es dann infolge der Zirkularisierung des Vektors zu einer Regenerierung der Expression des eGFP-Gens durch den SV40-Promotor. Die Zellen, die nach der Rekombinationsreaktion eine eGFP-Expression aufweisen, enthalten den episomal replizierenden Vektor und können somit auf ihre differentiellen Eigenschaften bezüglich ihrer Expression und ihrer Vektorstabilität untersucht werden.

3.4.3. Die Flp-vermittelte Exzision führt effizient zur Generierung von Minimalepisomen

Durch die Flp-vermittelte Exzision eines spezifischen Sequenzabschnitts aus einem zuvor in das Genom integrierten Konstrukt konnte ein effizient replizierendes und exprimierendes Minimalepisom generiert werden (s. Kapitel 2.3.2.5). Hierfür wurde ein Parentalklon verwendet, in dem das linearisierte, cmv-Promotor-freie Plasmid pEpi-FGSARF in zwei Kopien in einer „*head-to-tail*“ Anordnung vorlag und daher eine Expression aufwies. Dennoch konnte hier ein „*Promotor-Trap*“ erfolgreich durchgeführt werden. Nach der transienten Expression der Flp-Rekombinase trat in dem Parentalklon eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität um 57 % auf. Diese Verschiebung konnte in direkte Relation mit der Generierung von Minimalepisomen in diesen Zellen gebracht werden. Im integrierten Zustand ist zwischen dem SV40-Promotor und dem eGFP-Gen die *neo^r*-Kassette lokalisiert, wodurch offensichtlich eine Abschwächung der Promotorfunktion auf die eGFP-Expression stattgefunden hat. Erst nach der Exzision befindet sich der Promotor unmittelbar im 5'-Bereich des zu exprimierenden eGFP-Gens und kann somit zu einer Erhöhung der Expression beitragen.

Die Zellen, die nach der Rekombinasetransfektion eine erhöhte eGFP-Expression aufwiesen, wurden vereinzelt und charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass in neun dieser Subklone eine vollständige Exzision des spezifischen Vektoranteils stattgefunden hat, die

zur Bildung eines funktionellen Minimalepisoms führte. Die anschließenden Expressionsanalysen der exzisierten Subklone zeigte eine eGFP-Expression in 100 % der Zellen mit einer relativen Fluoreszenzintensität, die mindestens doppelt so hoch war wie der Wert des Parentalklons (s. Abb. 2.21). Diese hohe Expression blieb über den gesamten Messzeitraum stabil.

Insgesamt konnte durch die Flp-vermittelte Exzision eines Minimalepisoms Folgendes gezeigt werden:

- Nach der Etablierung eines exzisierten Episoms ist zur Aufrechterhaltung des episomalen Status in der Zelle, sowie zur Langzeitstabilität der Expression kein Selektionsdruck notwendig. Es konnte eine hohe und stabile Expression des Transgens im episomalen Vektor gezeigt werden.
- Die Deletion unerwünschter und für den Erhalt eines episomal replizierenden Vektors unnötiger prokaryontischer Vektorsequenzen wurde durchgeführt. Die Expression einer einzigen Transkriptionseinheit ist demnach für den Erhalt des Episoms notwendig und ausreichend.
- Das replizierende Minimalepisom kann als Vehikel mit erweiterter Klonierungskapazität genutzt werden, wobei unterschiedlichste Gene inseriert und effizient exzisiert werden können.
- Die Replikation des Episoms beginnt nach der Exzision mit einer definierten, durch die Anzahl der integrierten Konstrukte vorgegebenen Kopienzahl. Dadurch werden quantitative Analysen hinsichtlich der Replikations- und Expressionsstabilität von Episomen ermöglicht.

Durch Flp-vermittelte Rekombination wurde hier ein System zur Generierung von Minimalepisomen etabliert. Dieses kann der Klärung weitreichender Grundlagenorientierter und auch biotechnologischer Fragestellungen dienen. Die weitere Optimierung der funktionellen Elemente dieses Vektorsystems steht hierbei im Vordergrund. Das S/MAR-Element ist hier das primäre Objekt, da nachgewiesen wurde, dass von dieser Sequenz die Stabilität des episomal replizierenden Vektorsystems ausgeht. Analysen, die auf der Verwendung von kleineren, oligomerisierten Sequenzabschnitten mit S/MAR-Funktion basieren (Kay und Bode, 1995; s. Kapitel 3.6.2), werden von einem Kooperationspartner durchgeführt und lieferten bereits vielversprechende Hinweise auf die Funktionalität dieser kürzeren DNA-Abschnitte. Diese können somit eine weitere Verringerung der Größe des Vektorsystems herbeiführen, wodurch dessen Klonierungskapazität beispielsweise für das Einbringen weiterer Transgene erweitert wird. Zudem lassen sich aus einem solchen Ansatz Hinweise auf die Funktionalität dieser oligomerisierten Sequenzabschnitte bezüglich ihrer Eigenschaften als Initiationssequenzen für die Replikation ableiten.

3.4.4. Erfolgsstrategien für die Exzision

Eine erfolgreiche und spezifische FLP-vermittelte Exzisionsreaktion ist stets abhängig von der Exzisionsstrategie und von den Charakteristiken des verwendeten Parentalklons. Dies wurde anhand verschiedener zur Exzisionsreaktion herangezogener Parentalklone bestätigt. In einem der untersuchten Parentalklone konnte beispielsweise kein funktionelles Minimalepisom exzidiert werden, obwohl sowohl die Vollständigkeit des integrierten Vektors als auch die generelle Funktionalität der verwendeten Rekombinase gezeigt wurde. Daher könnte in diesem Klon eine Mutation im Bereich der FRT-Sites stattgefunden haben. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass die Zugänglichkeit der FRT-Sites durch den spezifischen Integrationsort des Vektors in dieser Zelle für die FLP-Rekombinase erschwert ist (Ahmad und Golic, 1996). Der Integrationsort des Konstrukts im Parentalklon könnte somit eine entscheidende Rolle spielen. Je nach der vorherrschenden Chromatinstruktur und der damit verbundenen Zugänglichkeit des Integrationsortes für die Rekombinase würde eine Exzisionsreaktion bevorzugt stattfinden. Zudem besteht die Möglichkeit, dass die Position des integrierten Konstrukts im Genom auch die Position des exzidierten Episoms in der Kernarchitektur liefert. Die stabile Expression in den Zellen des hier erfolgreich exzidierten Parentalklons (s. Kapitel 2.3.2.5) könnte darauf hinweisen, dass in diesem Klon eine spezifische Integration in einen Bereich des Genoms stattgefunden hat, der durch die Assoziation mit wichtigen Kernstrukturen bevorzugt eine stabile Expression gewährleistet. Der episomal replizierende Vektor liegt in Metaphasechromosomen assoziiert mit Bereichen der Kernmatrix und somit nicht frei im Zellkern vor (Baiker et al., 2000). Durch die vorgegebene Position des integrierten Konstrukts im zellulären Genom könnte eine spezifische Anheftung des Episoms in bestimmten Bereichen der Kernmatrix erfolgen, die zu einer stabilen Replikation und Expression des Episoms beitragen, wie es für die hierbei generierten Subklone dargestellt wurde. Daher besteht die Möglichkeit, dass Episomen stets mit bestimmten Bereichen des Chromosoms assoziiert und somit in einem topologisch günstigen Umfeld bezüglich der vorliegenden zellulären Faktoren vorliegen, wie es für bestimmte Chromosomenterritorien gezeigt werden konnte (Cremer und Cremer, 2001).

Folglich spielt für die erfolgreiche Exzision eines Minimalepisoms aus einem stabil im zellulären Genom integrierten Vektor die chromosomale Umgebung eine wichtige Rolle. Das umgebende Chromatin und dessen positiver Einfluss auf die Expression des Transgens könnte für die stabile Replikation des exzidierten Minimalepisoms vorherbestimmend sein,

da gezeigt werden konnte, dass die Replikation stets mit einer aktiven Transkription der auf dem Vektor befindlichen Transkriptionseinheit einhergeht (s. Kapitel 3.1.3).

3.5. Nutzung und Ausweitung des episomalen Vektorsystems

Um den universellen Einsatz und die Leistungsfähigkeit des episomalen Vektorsystems zu sondieren, wurde ein Austausch des im Vektor pEpi-1 vorhandenen eGFP-Gens durch Gene vorgenommen, die zum einen für die leichte und zum anderen für die schwere Kette des Immunglobulin G-Moleküls kodieren (s. Abb. 2.22). Dieser Ansatz bietet die Möglichkeit, den Ausbau auf ein Co-Expressionssystem durchzuführen und dieses mit vorhandenen Expressionsstrategien zu vergleichen und bewerten. Dieses Co-Expressionssystem hat den Vorteil, dass die beiden Antikörperketten, die jeweils unter der Kontrolle des cmv-Promotors stehen, auf verschiedenen Vektoren lokalisiert sind, wodurch Promotorinterferenzen minimiert werden (Kadesch und Berg, 1986). Bei der Transfektion verschiedener Antikörper-kodierenden Vektoren in CHO-K1-Zellen, stellte sich im Klongemisch heraus, dass das Vorliegen beider Antikörperketten-Gene auf demselben Vektor, im Vergleich zu den jeweils co-transfizierten Vektoren, die jeweils nur für die leichte und die schwere Kette kodieren, zu einer höheren Expression des IgG-Moleküls führt (s. Kapitel 2.4.1). Durch das Vorhandensein zweier Transkriptionseinheiten, die beide den cmv-Promotor enthalten, haben sich jedoch zum einen die Größe des Vektors für eine episomale Replikation und zum anderen die parallel vorliegenden Promotoren als problematisch für die Etablierung des episomal replizierenden Vektorsystems erwiesen. Aus diesen Gründen wurde im weiteren Verlauf eine Ausweitung auf ein doppeltes Selektionssystem durchgeführt. Von McLean et al. (2000) konnte gezeigt werden, dass ein Doppelselektionssystem zur stabilen Expression eines rekombinanten IgA-Moleküls in NSO-Zellen führte. Dabei wurde eine sequenzielle stabile Integration zweier Plasmide in das zelluläre Genom durchgeführt. Diese kodierten analog zu dem in dieser Arbeit verwendeten IgG-Molekül ebenfalls entweder für die leichte oder die schwere Kette. Über Western Blot- und ELISA-Analysen wurden die erwarteten Proteingrößen, sowie die Expression des Antikörpermoleküls verifiziert. Horlick et al. (2000) zeigten die stabile Expression und Replikation eines auf EBV-basierenden episomal replizierenden Vektors. Dabei wurde ein kombinatorisches Drei-Vektor-System mit jeweils unterschiedlichen Selektionsmarkern etabliert.

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand der Expressionsanalysen des Vektors, der für die schwere Kette kodiert, gezeigt werden, dass die Sekretion der schweren Kette, deren

intrazellulärer Gehalt relativ hoch ist, wahrscheinlich durch eine Fehlfaltung im Endoplasmatischen Retikulum (Bonifacino und Klausner, 1994) erschwert wird (s. Abb. 2.23). Daher wurde die *neo^r*-Kassette des Vektors, der für die schwere Kette kodiert, durch ein Gen zur Vermittlung einer Puromycin-Resistenz ausgetauscht, um über die Anpassung des Selektionsdrucks eine Harmonisierung der Expression und Sekretion des Antikörpermoleküls zu erreichen.

3.5.1. Strategien zur Etablierung episomal replizierender Vektoren im Co-Expressionssystem

Zur Etablierung eines effizient replizierenden episomalen Co-Expressionssystems wurden zwei unterschiedliche Strategien verglichen. Dabei wurden zum einen die beiden verwendeten Vektoren sequenziell und zum anderen beide Vektoren parallel in CHO-K1-Zellen eingebracht. Der sequenzielle Transfer bietet den Vorteil, dass zunächst eine Selektion auf den leichter zu etablierenden Vektor stattfinden, sowie dessen Expression und Stabilität überprüft werden kann. Die Transfektion des zweiten Vektors in einen charakterisierten Klon führt zu einer Veränderung der Expressionseigenschaften, welche zudem durch eine Anpassung des Selektionsdrucks gezielt beeinflusst werden können.

Für den sequenziellen Ansatz wurde zuerst der Vektor, der für die leichte Kette des IgG-Moleküls kodiert, in CHO-K1-Zellen elektroporiert. Eine Charakterisierung der entstandenen Klone auf den episomalen Status des Vektors und dessen Expression folgte, woraufhin ein repräsentativer Klon zur Übertransfektion mit dem Vektor, der das Gen für die schwere Kette enthält, ausgewählt wurde. Zur Übertransfektion der Zellen fanden zwei unterschiedliche Methoden des DNA-Transfers in die Zelle Verwendung. Der Vektor, der die schwere Kette kodiert, wurde zum einen über eine Elektroporation und zum anderen über eine Lipofektion in die Zellen eingebracht. Die Elektroporation führte nicht zum Erfolg, da pEpi-HP stets in das zelluläre Genom integrierte, während der bereits in diesen Zellen episomal replizierende Vektor, der für die leichte Kette kodiert, stabil erhalten blieb (s. Kapitel 2.4.3). Wie bereits gezeigt, kommt es bei der Elektroporation eines zirkulären Vektors durch die Anwesenheit von Einzelstrangbrüchen in der Plasmid-DNA vermehrt zu deren unerwünschter Integration in das zelluläre Genom (s. Kapitel 3.2). Auch in diesem Fall schien eine Integration des Vektors aufgrund von Instabilitäten der DNA-Struktur stattgefunden zu haben, welche mit dem Austausch des Vektorrückgrats zusammenhängen mag. Daher wurde die Übertransfektion mit dem Vektor, der für die schwere Kette kodiert, über eine Lipofektion durchgeführt. Diese Lipofektion führte zu einer episomalen

Replikation des Vektors pEpi-HP zusätzlich zu dem hier bereits vorliegenden episomal replizierenden Vektor pEpi-K. Dabei konnte auf die Generierung von einzelnen Subklonen verzichtet werden, da bereits im Klongemisch gezeigt werden konnte, dass beide Vektoren simultan episomal vorliegen, ohne dass eine zusätzliche Integration stattgefunden hat (s. Abb. 2.27). Das Vorliegen ausschließlich episomal replizierender Vektoren im Klongemisch zeigt, dass durch die Transfermethode der Lipofektion eine sehr hohe Stabilität der transfizierten DNA erreicht werden kann.

Aufgrund der erfolgreichen Etablierung eines Co-Expressionssystems durch die Übertransfektion des zweiten Vektors über eine Lipofektion, wurde auch eine parallele Transfektion beider Vektoren vorgenommen. Dieses führte ebenfalls zur Etablierung eines episomal replizierenden Co-Expressionssystems. Eine Generierung einzelner Klone ist demnach auch hier nicht mehr notwendig, da nur ein verschwindend geringer Anteil an zusätzlichen Integrationen der Vektoren in einem der untersuchten Klongemische detektiert werden konnte. Für eine differentielle Analyse im zellulären System bietet jedoch die Generierung einzelner Klone generell den Vorteil eines vordefinierten zellulären Hintergrunds in Bezug auf Expressions- und Stabilitätseigenschaften.

Die Lipofektion ist demnach eine überaus geeignete DNA-Transfer-Methode zur Generierung episomaler Co-Expressionssysteme. Die hierfür verwendeten Vektoren können sowohl parallel als auch nacheinander in die Zellen eingebracht werden. Eine stabile Replikation der Vektoren wird auch im Klongemisch gewährleistet. Dabei führt die Verwendung Antikörper-kodierender Gene anstelle des eGFP ebenso effizient zur episomalen Replikation der Vektoren. Das episomal replizierende Vektorsystem verspricht somit eine breite Anwendbarkeit für unterschiedlichste Transgenexpressionsansätze.

3.5.2. Die Expressionshöhe episomaler Vektoren ist über den Selektionsdruck beeinflussbar: Aufbau eines regulierbaren Co-Expressionssystems

Die durch eine Lipofektion erhaltenen Co-Expressionssysteme wurden bezüglich ihres Expressionsverhaltens untersucht. Die Expressionsanalyse des sekretierten Anteils des IgG-Moleküls zeigte, dass sowohl das sequenziell als auch das parallel etablierte Co-Expressionssystem für eine Antikörperproduktion in CHO-K1-Zellen geeignet ist. Die Expression lag hierbei etwa um das zehnfache höher als in den verwendeten Kontrollklonen, in denen beide Antikörperketten hintereinander auf einem Vektor lokalisiert sind und stabil in unterschiedlichen Kopienzahlen in das Genom integriert wurden (s. Abb. 2.27).

Eine Variation der Expressionshöhe konnte dabei in Abhängigkeit des Selektionsdrucks festgestellt werden. Eine parallele Lipofektion der Vektoren mit einer anschließenden Selektion auf die unterschiedlichen Resistenzgene (*neo^r* und *puro^r*) beider Vektoren ergibt eine Expression des IgG-Moleküls von etwa 100 ng IgG/10⁶ Zellen in 24 Stunden (s. Abb. 2.27). Die Zellen, die bereits den episomal replizierenden Vektor mit der leichten Kette enthielten und durch Übertransfektion zusätzlich den Vektor mit der schweren Kette erhielten, zeigten eine Expression, die doppelt so hoch war wie für parallel etablierte Episomen. Der sequenzielle Transfer ist somit zum Zwecke der Hochexpression, nicht jedoch für die Generierung eines episomalen Co-Expressionssystems generell, dem simultanen Transfer zu bevorzugen.

Nach dem sequenziellen Transfer des Vektors mit der schweren Kette wurden die erhaltenen Subklongemische unter verschiedenen Selektionsbedingungen weiter kultiviert. Zum einen fand eine Doppelselektion auf beide Vektoren des Co-Expressionssystems statt und zum anderen lediglich eine Selektion auf den Vektor, der die schwere Kette kodiert. Beide Selektionsbedingungen lieferten dabei vergleichbare Expressionslevel. Der Vektor, der die leichte Kette exprimiert, benötigt daher zur stabilen Expression keine Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks während der Etablierung des Co-Expressionssystems. Durch die Einzelselektion auf die Puromycinresistenz des Vektors mit der schweren Kette konnte eine Erhöhung der Kopienzahl dieses Vektors im Vergleich zur Doppelselektion gezeigt werden (s. Abb. 2.26). Der Anteil eines Vektors in einem Co-Expressionssystem kann somit zumindest bei der Etablierung des Vektors nach der Transfektion in die Zelle gezielt über die Variation des Selektionsdrucks beeinflusst werden. Dies ermöglicht die Ermittlung des optimalen molaren Verhältnisses der Vektoren zueinander. Somit können Zellen mit einer höchstmöglichen Expression selektiert werden. Die Abhängigkeit der Langzeitstabilität vom Selektionsdruck bezüglich der Expression und des episomalen Status in den Zellen kann zudem überprüft und bewertet werden.

Das hier vorgestellte auf episomal replizierenden Vektoren basierende, regulierbare Co-Expressionssystem demonstriert die Durchführbarkeit eines neuen Grundprinzips. Dabei werden Schwierigkeiten, wie sie bei integrierten Systemen mit Mehrfachkopien in Form von Co-Suppression und Promotorinterferenzen auftreten können, umgangen oder minimiert.

3.6. Ausblick

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Optimierung und Charakterisierung wichtiger Aspekte zur Generierung episomal replizierender Vektoren. Hierbei zeigte sich die transkriptionsbedingte Konformationsänderung des S/MAR-Elements für die stabile Replikation des Episoms als essenziell. Das S/MAR-Element liefert die für die Bindung der Replikationsfaktoren notwendigen Sequenzen im episomalen Vektor. Zudem konnten die minimal notwendigen Komponenten, die zur Ausbildung eines funktionellen episomalen Vektors führen, bestimmt werden. Dabei wurden prokaryontische Sequenzen weitestgehend aus dem Vektor entfernt, wodurch erstmals eine vom Selektionsdruck unabhängige stabile Replikation und Expression gezeigt werden konnte. Durch die Optimierung des DNA-Transfers in die Zelle konnte erstmals ein stabil episomal replizierendes Co-Expressionssystem etabliert werden. Weiterhin wurden zwei verschiedene sequenzspezifische Rekombinationssysteme angewendet und für das jeweils verwendete episomal replizierende Vektorsystem optimiert.

Diese Erkenntnisse dienen als Basis für die Bearbeitung weiterführender Grundlagenorientierter und biotechnologischer Fragestellungen. Im Folgenden wird daher ein Überblick über andere Möglichkeiten zur Verwendung dieses episomal replizierenden Vektors gegeben.

3.6.1. Generierung eines Co-Expressionssystems durch sequenzspezifische Exzision

Eine Alternative zur Generierung eines episomal replizierenden Co-Vektorsystems bietet die in dieser Arbeit vorgestellte Exzision spezifischer Vektorsequenzen aus dem zellulären Genom. Diese führte effizient zur Deletion prokaryontischer Bereiche, welche einen negativen Einfluss auf die Expressionsstabilität und somit auf die Replikation ausüben. Durch strategisch positionierte Rekombinase-Erkennungsstellen kann die Exzision auf beliebige Vektoren übertragen und individuell beeinflusst werden.

Zur Generierung eines Co-Expressionssystems mit stöchiometrischer Anzahl der verwendeten Vektoren kann die sequenzspezifische Exzision benutzt werden. Analog zu dem hier vorgestellten Exzisionskonzept wird ein Vektor zunächst in das Genom integriert. Enthält dieses integrierte Konstrukt dann beispielsweise sowohl die leichte als auch die schwere Kette, sowie sämtliche minimal notwendigen Sequenzen zur Expression und

Replikation, so kann die Rekombinase-vermittelte Exzision zur Generierung zweier unabhängiger, stabil replizierender Minimalepisomen führen, die zusammen ein funktionales Antikörpermolekül exprimieren.

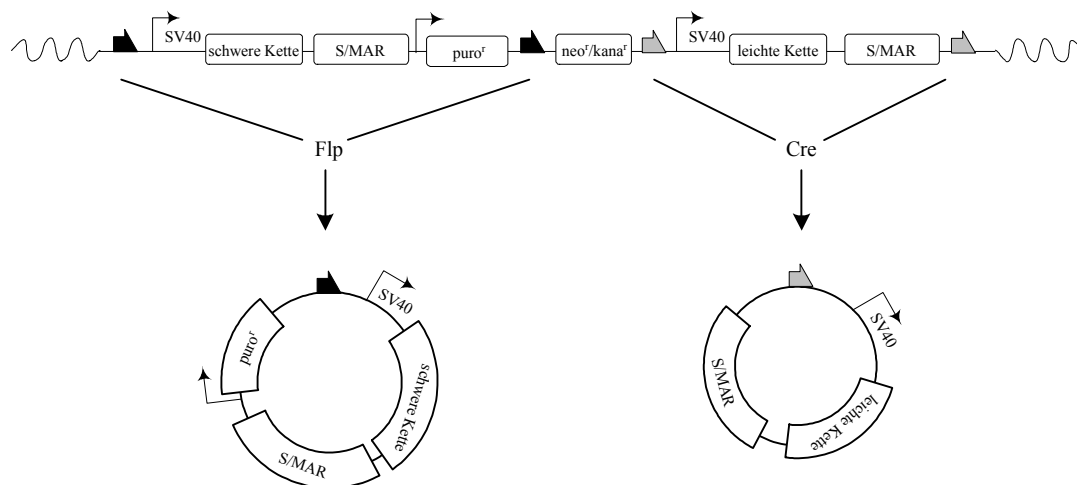


Abb. 3.1: Exzision zweier Minimalepisomen aus einem Parentalkonstrukt.

Das linearisierte und im Genom integrierte Konstrukt kodiert beide Antikörperkettengene, die jeweils am 3'-Ende von einem S/MAR-Element begrenzt sind. Durch die parallele Verwendung der beiden Rekombinasesysteme Cre/loxP und Flp/FRT können zwei voneinander unabhängige Episomen exzidiert werden. Die strategische Anordnung der Rekombinase-Erkennungsstellen und die Selektion auf die Expression der jeweiligen Rekombinaseplasmide, z. B. über deren Fusion mit GFP oder RFP kann dabei zur Anreicherung des Exzisionsereignisses führen. Die exzidierten Vektoren liegen somit im gleichen molaren Verhältnis in der Zelle vor und sichern dadurch eine harmonisierte Expression.

Nicht benötigte Vektorabschnitte, wie prokaryontische Sequenzen, gehen nach der Rekombination im Verlaufe der Zellteilungen verloren. Die zwei episomal replizierenden Vektoren liegen somit im gleichen molaren Verhältnis zueinander vor und bieten damit eine Voraussetzung zur stabilen Expression des gesamten IgG-Moleküls. Eine Selektion zur Harmonisierung der Expression wäre eventuell überflüssig, aber durch eine Beibehaltung beider oder auch nur eines Selektionsmarkers (s. Abb. 3.1) immer noch möglich.

3.6.2. RMCE zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mit Ori-Funktion

Zur Vertiefung des Verständnisses der Funktion eines Oris in höheren Eukaryonten, sowie für die Klärung der Beziehungen zwischen S/MAR-Elementen und den Startstellen der Replikation, kann ein Austausch der im Vektor pEpi-1 vorliegenden S/MAR-Sequenz durchgeführt werden. Die biomathematische Analyse wichtiger Strukturprinzipien kann dabei eingesetzt werden, um vorhandene oder künstlich generierte S/MAR-Elemente zu isolieren bzw. zu entwerfen und auf ihre Funktionalität im episomalen Vektorsystem zu überprüfen.

Diese chromosomalen Regionen können dabei z. B. aus BACs („*bacterial artificial chromosomes*“), welche den Typ I Interferoncluster des Menschen und auch der Maus abdecken, verwendet werden. Auch das hier verwendete S/MAR-Element stammt aus der Domäne dieses Interferonclusters. Ob eines der weiteren dort vorhandenen, zum Teil kürzeren S/MAR-Elemente eine stabile episomale Replikation herbeiführt, kann somit überprüft werden. Vorhergehende DNA-Bindungsexperimente können dabei die Auswahl der zu untersuchenden Sequenzabschnitte einschränken. Zudem geben Vorhersagen des Potenzials spezifischer Sequenzen zur Einzelstrangbildung durch Computerprogramme einen Aufschluss auf die Verwendbarkeit dieser DNA-Abschnitte für die Untersuchung auf die Vermittlung einer Replikationsstabilität im episomalen System. Auch künstlich hergestellte S/MAR-Elemente können hier eingesetzt werden. Standard-S/MARs zeichnen sich durch eine Serie an so genannten „*unpairing elements*“ (UE) aus. Diese umfassen bei uns 100 bis 150 bp und führen durch ihre Interaktionen zur Matrixbindung. Eine Oligomerisierung dieser Sequenzen steigert dabei die Affinität zur Matrix, sowie das transkriptionelle Potenzial, welches von dieser Sequenz ausgeht (Kay und Bode, 1995). Die Oligomerisierung hat eine Veränderung des „*unwinding*“-Potenzials, sowie der Sekundärstrukturbildung zur Folge, wodurch der Vergleich mit einer Ori-ähnlichen Funktion vorgenommen werden kann. Eine Vermittlung episomaler Stabilität konnte für diese DNA-Sequenzen bereits gezeigt werden (Lipps, unveröffentlicht).

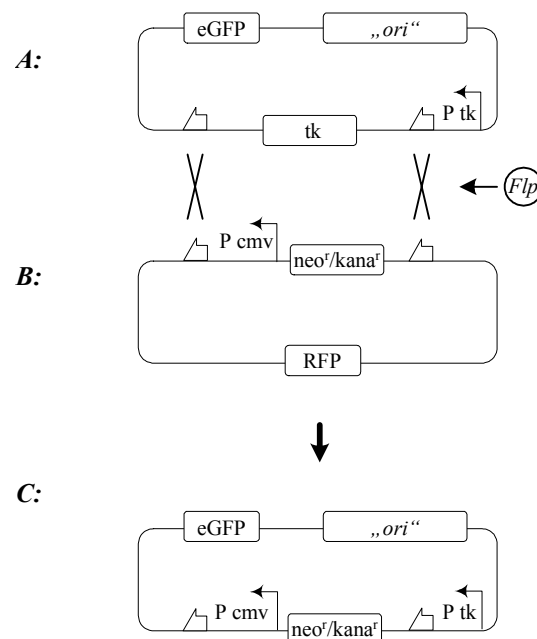


Abb. 3.2: „ori-trap“ durch RMCE (=Recombinase mediated cassette exchange).

In den unter A: dargestellten Vektor wird eine Bank genomischer Sequenzen eingebracht („ori“), deren Funktionalität in diesem System getestet werden soll. Bei einem Co-Transfer der Konstrukte A und B in konstitutiv Flp-exprimierende Zellen kommt es zu einer Rekombination zwischen den heterologen Rekombinase-Erkennungsstellen, wodurch ein Austausch der Expressionskassette resultiert (RMCE; Schlake und Bode, 1994). Das RFP-Gen dient dabei der Positivselektion durch eine FACS-Sortierung und die Thymidinkinase der Negativselektion, um mögliche verbliebene, nicht rekombinierte Vektoren durch eine Gancyclovirselektion zu eliminieren. Im rekombinierten Vektor liegt somit das eGFP-Gen aus Vektor A unter der Kontrolle des cmv-Promotors aus Vektor B. Zudem wird die neo^r/kana^r-Kassette vom tk-Promotor kontrolliert. Erlangt das resultierende Konstrukt durch die unter „ori“ eingebrachte Sequenz eine episomale Stabilität, so kann diese Sequenz über geeignete Primer und eine PCR-Analyse isoliert und charakterisiert werden.

Das in der vorgestellten Arbeit verwendete S/MAR-Element ist durch seine sequenzspezifischen und biologischen Funktionen nach den bisherigen Erkenntnissen hauptsächlich für die Aufrechterhaltung eines episomal replizierenden Vektors in einer Zelle verantwortlich. Durch die Verwendung einer Ori-Falle können weitere, eventuell sogar besser geeignete Sequenzen isoliert werden. Dabei erfolgt die Selektion direkt auf die biologische Aktivität der Sequenz und nicht primär auf ihre S/MAR-Eigenschaften.

Die weitere Optimierung des hier dargestellten Vektorsystems basierend auf pEpi-1 dient dem weiteren Verständnis und der Nutzung der biologischen Funktionen von Replikation und Transkription im Zusammenspiel mit Chromatinstrukturen. Dabei können die gewonnenen Erkenntnisse zur Generierung eines stabilen und sicheren Vektors für einen Einsatz in gentherapeutischen Fragestellungen dienen.

4. Material und Methoden

4.1. Geräte

Tischzentrifugen	Minifuge Heraeus-Christ, Biofuge pico Eppendorf Centrifuge 5417 C Hettich Rontanta/S
Kühlzentrifugen	Sorvall RC 5 Minifuge Heraeus-Christ, Biofuge fresco
Rotoren	34 und GSA
Speedvac concentrator	Savant Instruments Inc. mit Ölschieber-Vakuum- pumpe und Kühlfalle
Photometer	Hitachi U-1100
Fluorometer	Hoefer Dyna Quant 200
Scintillationszähler	Beckman LS 6500
Gelelektrophoresekammer	BRL Horizon 58, BRL Horizon 1114, BRL Horizon 2025
Mikroskop	Olympus CK 2, Leitz Labovert, Zeiss Axiovert TV 135 mit Fluoreszenzvorrichtung
UV-Kammer	Hanau
Phosphoimager	Molecular Dynamics
Videograph	Biotec Fischer Video Densitometer, Mitsubishi Thermodrucker und Personal Computer
Fluoreszenz-Elisa-Reader	Labsystems Multiskan MS
Netzgeräte	Biorad Power Pac 300
Durchflusszytometer	FACScan von Becton Dickinson FACSCalibur von Becton Dickinson Macintosh Quadra 650
Zellzähler	Schärfe System Casy 1
Zellkultur-Inkubatoren	Forma Scientific Water-jacketed Incubator Modell 3336
Cleanbenches	Mecaplex, Sterilcard Hood VBM600 und SG400 Heraeus, HLB 2448 Heraeus, HSP 18
pH-Meter	M 340, Beckmann
PCR-Maschine	Biometra T3 Thermocycler

Thermomixer	Eppendorf Thermomixer 5436
Vortex	Scientific Industries Vortex Genie 2
Elektroporator	Biorad Gene Pulser und Pulse Controller
Hybridisierungssofen	Robbins Scientific Hybridization Incubator Model 310
	Stuart Scientific Hybridization Incubator
Laborschüttler	Heidolph
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore Milli-Q

4.2. Materialien

Filterpapiere und Transferfolien

Sterilfiltration	Sartorius Membranfilter, Porengröße 0,45 μm und 0,22 μm , d = 47 mm
Nylonmembran	Amersham Pharmacia Biotech Hybond-XL Gene-Screen-Plus, Fa. DuPont
DEAE-Papier	Whatman 3MM

Autoradiographie

Expositionskammer Molecular Dynamics Expositionskassetten für den Phosphorimager

Chemikalien

Es wurden Chemikalien der Firmen Bayer, Biolabs, Boehringer, Difco, Flow, Fluka, Gibco, Hoechst, Invitex, Macherey-Nagel, Merck, Peqlab, Pharmacia, Promega, Qiagen, Serva, Sigma, Stratagene und USB verwendet. Radiochemikalien wurden von Amersham-Buchler bezogen. Die Enzyme lieferten Amersham-Buchler, BRL, Biolabs, Boehringer, Pharmacia, Roche Pharma und USB. Oligonukleotidsynthesen und DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma MWG durchgeführt.

Zellkulturmaterialien

Das Plastik-Zellkulturmaterial für die eukaryontischen Zellen wurde von den Firmen Costar, Gibco, Greiner, Nunc und Seromed bezogen.

Computerprogramme

Die Texte und Abbildungen dieser Arbeit wurden mit den Programmen *Microsoft Word*, *Visio* und *Excel* sowie *Corel PHOTO-PAINT 11* und *CorelDraw11* erstellt. Zur Literaturrecherche dienten *Medline*, *Current Contents* sowie *Current Contents Connect*. Zur Durchführung von Sequenzanalysen und Restriktionskartierungen wurden *Vektor NTI 4.0* und *5.0* von ATCC, die von C. Karremann entwickelten Programme *CUT* und *All In One* verwendet. Die Auswertung von Autoradiographien erfolgte mit *Image Quant Version 5.0* von Molecular Dynamics. Die Auswertung von FACS-Analysen erfolgte mit *Cell Quest Pro*.

4.3. Allgemeine Grundtechniken

(nach Sambrook et al., 1989)

4.3.1. Sterilisieren

Glasgeräte werden vor Gebrauch 4 Stunden bei 180° C hitzesterilisiert.

Alle Lösungen werden sterilfiltriert (0,22 µm Filter) oder autoklaviert (20 Minuten, 121°C, 1 bar).

4.3.2. Phenolisierung von Nukleinsäuren

Phenol (Fa. Roth): redestilliertes, in TE äquilibriertes Phenol, pH 7,5-8,0, Zusatz von 0,1 % (w/v) 8-Hydroxychinolin

TE: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, pH 8,0

Die wässrige Nukleinsäurelösung wird im Eppendorfgefäß mit 1 Volumen Phenol versetzt und auf dem Vortex-Mixer gemischt. Zur besseren Phasentrennung wird 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugesetzt. Die Phasen werden durch eine kurze Zentrifugation getrennt. Phenolreste werden durch zweimaliges Extrahieren mit Chloroform/Isoamylalkohol beseitigt. Das durch Zugabe von 2 Volumen Ethanol erhaltene Präzipitat wird zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE aufgenommen.

4.3.3. Fällung von Nukleinsäuren

Zur Fällung versetzt man 1 Volumen wässriger DNA-Lösung mit 2 Volumen 0,6 M LiCl in Ethanol, fällt für 10 Minuten bei 4°C und zentrifugiert anschließend 30 Minuten mit

13000 UpM bei 4°C. Das Pellet wird mit 70 % Ethanol gewaschen und im Vakuum oder bei 37°C getrocknet. Neben Ethanol kann auch Isopropanol zur DNA-Fällung benutzt werden, wobei das 0,6fache Volumen der DNA-Lösung eingesetzt wird.

4.3.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

4.3.4.1. Photometrische Bestimmung

Die Extinktion der Nukleinsäure wird photometrisch bei 260 nm bestimmt. Eine Extinktion von 1 bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm entspricht annähernd 50 µg DNA bzw. 35 µg RNA in 1 ml Volumen. Hierbei ist die optische Dichte der DNA-Lösung abhängig vom GC-Gehalt. Bei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA mit einem 72 %igen GC-Anteil beträgt die OD 1,04, während bei einem 30 %igen GC-Anteil die OD 0,94 beträgt. Das Verhältnis der bei 260 nm und 280 nm gemessenen Extinktionen sollte für eine sorgfältig präparierte und proteinfreie Nukleinsäure zwischen 1,8 (DNA) und 2,0 (RNA) liegen.

4.3.4.2. Fluorometrische Bestimmung

Hoechstfarbstoff H33258

Kalbsthymus-DNA Standard: 100 µg/ml

10x TNE-Puffer: 100 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 7,4

Färbelösung: 0,1 µg/ml Hoechstfarbstoff in 1x TNE-Puffer

Die Konzentration wird mit Hilfe eines Fluorometers ermittelt. Dazu werden 2 µl der zu bestimmenden DNA-Lösung in 2 ml Färbelösung (vorgelegt in der Küvette) bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$ angeregt und die Intensität der Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ gemessen. Die Eichung des Gerätes erfolgt durch 2 µl des DNA-Standards in 2 ml der Färbelösung.

Geringe Nukleinsäuremengen lassen sich auch durch Elektrophorese eines Aliquots abschätzen. Die Fluoreszenzintensität der Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid unter UV-Licht ist ihrer Menge direkt proportional. Daher kann durch visuellen Vergleich der unbekannten Probe mit einer DNA bekannter Konzentration die unbekannte Menge abgeschätzt werden.

4.4. Arbeiten mit *E.coli*

4.4.1. Verwendete *E.coli*-Stämme

- DH10B: F', mcrA⁻-(mrr hsdRMS-mcrBC), Φ 80*lacZ*M15, *lacX*74, *deoR*, *recA*1, *ara*139, *(ara-leu)*7697, *galU*, *galK*, λ , *rpsL*, *endA*1, *nupG*
- XL1-Blue: *recA*1, *endA*1, *gyrA*96, *thi*-1, *hsdR*17, *supE*44, *relA*1, *lac* [F' proAB, *lacI*^qZ)M15, Tn10, (Tet^r)], (Bullock, 1987)
- Top10F': F', {*lacI*^q Tn10 (Tet^r)}, mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ 80*lacZ* Δ M15, Δ *lacX*74, *deoR*, *recA*1, *araD*139, *(ara-leu)*7697, *galU*, *galK*, *rpsL*, *endA*1, *nupG* (Firma Invitrogen)

4.4.2. Kulturmedien für Bakterien

- LB-Medium: 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, autoklavieren.
- TB-Medium : 12 g Bacto-Trypton, 24 g Bacto-Hefeextrakt, 4 ml Glycerin, ad 900 ml, autoklavieren; vor Gebrauch werden 100 ml steriles 17 mM KH₂PO₄, 72 mM K₂HPO₄ zugesetzt.

4.4.3. Herstellung von Agarplatten

Dem LB-Medium werden 15 g Agar pro Liter zugegeben. Zur Herstellung Ampicillin-haltiger Agarplatten wird 1/1000 Volumen Ampicillin einer sterilfiltrierten Stammlösung (50 mg/ml in Ethanol) beigemischt. Zur Herstellung Kanamycin-haltiger Agarplatten wird 1/2000 Volumen Kanamycin einer sterilfiltrierten Stammlösung (100 mg/ml in H₂O) zugegeben.

4.4.4. Herstellung elektrokompeter Bakterien

1 l LB-Medium wird mit 5 ml einer Übernachtskultur beimpft. Man lässt die Zellen bei 37°C unter starkem Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 1 wachsen und zentrifugiert sie anschließend 10 Minuten in einem vorgekühlten GS3-Rotor bei 3000 UpM ab. Das Zellpellet wird nun in 1 l kaltem Wasser resuspendiert und wie beim ersten Mal zentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationsschritt wird das Pellet in 500 ml kaltem Wasser aufgenommen und wiederum wie oben zentrifugiert. Nun wird das Pellet in 20 ml kaltem 10 %-igen Glycerin resuspendiert, wie beschrieben zentrifugiert und schließlich in einem Endvolumen von 2-3 ml 10 %-igem Glycerin resuspendiert. Die so aufgenommenen Zellen werden in 50 μ l-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

4.4.5. Elektrotransformation von *E.coli*

Bei der Elektrotransformation wird ein Gemisch aus DNA und kompetenten Zellen einem exponentiell abfallenden elektrischen Feld mit sehr hoher Ausgangsamplitude ausgesetzt. Die Transformationseffizienz liegt je nach Qualität der elektrokompenten Bakterien bei 10^9 - 10^{10} Transformanten/ μ g DNA.

Ein 50 μ l-Aliquot der kompetenten Zellen wird bei Raumtemperatur aufgetaut und auf Eis gestellt. 1 μ l einer Plasmid-DNA oder eines Ligationsansatzes wird hinzugegeben, gut gemischt, und der Ansatz in eine sterile, vorgekühlte 0,2 cm Elektroporationsküvette pipettiert. Anschließend wird die Küvette in der Elektrotransformationskammer einem elektrischen Feld ausgesetzt. Pulse Controller und Gene Pulser werden auf 2,5 kV, 25 μ F und 200 Ω eingestellt. Die Zeitkonstante, die am Gerät überprüft werden kann, sollte zwischen 4 und 5 ms betragen, die elektrische Feldstärke beträgt dann 12,5 kV/cm. Danach werden die Zellen sofort in 1 ml LB-Medium aufgenommen, in ein Kapsenberg Röhrchen überführt und bei 37°C 20 bis 30 Minuten geschüttelt. Anschließend werden unterschiedliche Mengen des Transformationsansatzes auf Agarplatten mit Selektionsmedium ausplattiert. Man lässt die Klone über Nacht bei 37 °C heranwachsen und kann sie dann durch eine „Mini“-Plasmidpräparation charakterisieren.

4.4.6. Konservieren von Bakterienkolonien

Zur kurzfristigen Lagerung werden die Bakterien auf Agarplatten ausgestrichen, bei 37 °C über Nacht inkubiert und im Kühlraum bei 4 °C aufbewahrt.

Eine langfristige Lagerung ist durch Vermischen einer 5 ml Übernacht-Kultur mit 87 % Glycerin im Verhältnis 1:1 und Aufbewahren bei -20 °C oder -70 °C möglich.

4.5. Isolierung von Nukleinsäuren

4.5.1. Plasmidisolierung im analytischen Maßstab mit der „Boiling Prep“-Methode

(nach Dan Cimbora, FHCR, Seattle)

Diese Methode eignet sich zur DNA-Isolierung für alle *E.coli* Laborstämme (DH5 ∇ , DH10B, XL1Blue), außer für CMK 603(recA+). Vorteile liegen in der schnellen Durchführung (etwa 30 min) und in der hohen Qualität der DNA (basiert auf „Boiling Prep“ nach Holmes and Quigley).

STET:	für 500 ml
8 % Sucrose	40 g
0,5 % Triton	12,5 ml Triton 20 %
50 mM EDTA	50 ml 0,5 M EDTA
10 mM Tris (pH8)	5 ml 1 M Tris/HCl
LTE:	10 mg Lysozym / 1 ml TE
7,5 M NH ₄ Ac	

TER: 10 µg RNase A / 1 ml TE

Autoklavierte Zahnstocher

Eine *E.coli* 2 ml LB/TB-Kultur mit dem entsprechenden Antibiotikum wird für 4 bis 16 h bei 37 °C geschüttelt. Nach Umfüllen in 2,2 ml-Eppendorfgefäße werden die Proben für 1 min bei 5000 UpM zentrifugiert. Die Pellets werden in je 500 µl STET-Puffer suspendiert und mit 50 µl LTE (10 mg/ml, bei -20 °C lagern) versetzt. Nach einer Inkubation von 2-3 min bei RT werden die Proben 90 Sekunden in einem Eppendorf Thermomixer bei 95 °C inkubiert. Nach fünfminütiger Zentrifugation (14000 UpM) bildet sich ein zähflüssiges Pellet, das mit einem Zahnstocher entfernt wird. Es werden 50 µl 7,5 M NH₄Ac und 500 µl Isopropanol zugefügt, gevortext und die DNA für 5 min bei 14000 UpM pelletiert. Nach einem kurzem Trocknen wird das Pellet in 100 µl TER-Lösung (RNase A 10 µg/ml) aufgenommen. Es werden 5 µl zur Restriktionsanalyse eingesetzt.

4.5.2. "Midi"-Plasmidpräparation (Qiagen)

Puffer P1 (Resuspensionspuffer):	50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A
Puffer P2 (Lysis-puffer):	200 mM NaOH, 1 % SDS
Puffer P3 (Renaturierungspuffer):	3,0 M NH ₄ OAc
Puffer QBT (Äquilibrierungspuffer):	750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15 % Ethanol, 0,15 % Triton X-100
Puffer QC (Waschpuffer):	1,0 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15 % Ethanol
Puffer QF (Elutionspuffer):	1,25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 8,5, 15 % Ethanol

Die zu präparierenden Bakterienklone werden in 200 ml LB-Medium in einer Schüttelkultur bei 37 °C über Nacht inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren (10 Minuten, 5000 UpM) werden die Kulturen nach den Angaben des Herstellers Qiagen aufgearbeitet. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgt bei dieser Methode durch die Bindung der

DNA an eine Anionenaustauscher-Säule basierend auf SiO_2 . Nach dem Entfernen von Verunreinigungen durch Waschschr tte wird die DNA mit einem Hochsalzpuffer von der Säule eluiert, mit Isopropanol präzipitiert und mit 70 % Ethanol entsalzt.

4.5.3. Präparative Isolierung von DNA aus *E.coli* mittels CsCl-Gradienten

(Ish-Horowicz et al., 1981)

Das Prinzip der DNA-Präparation durch einen CsCl-Gradienten beruht auf der Lyse der Zellen mit Lysozym und eine anschließende Aufschmelzung der doppelsträngigen chromosomalen und Plasmid-DNA durch NaOH/SDS. Die Plasmid-DNA renaturiert nach Zugabe von Kaliumacetat. Die chromosomale DNA bleibt einzelsträngig und fällt zusammen mit den Proteinen aus. Die Plasmid-DNA wird durch Isopropanol ausgef llt und über einen Cäsiumchlorid-Dichtegradienten von der restlichen chromosomalen DNA und der RNA abgetrennt.

Lösungen:

2 M Glucose	39,6 g/ 100 ml H_2O ; sterilfiltrieren. Lagerung bei 4 °C.
1 M Tris-HCl, pH 8,0	60,57 g/ 500 ml H_2O , pH 8 mit HCl einstellen, sterilfiltrieren. Lagerung bei RT.
1 M Tris-HCl, pH 7,5	
0,5 M EDTA	93,06 g/ 500 ml H_2O ; mit 10 N NaOH auf pH 8 einstellen, sterilfiltrieren. Lagerung bei RT.
1 N NaOH	(Firma Merck)
10 % SDS	50 g/ 500 ml H_2O
TB-Medium	12 g Bactrotrypton 24 g Bacto Yeast Extract 4 ml Glycerin in 900 ml H_2O , autoklavieren. Vor Benutzung Zugabe von sterilem 0,17 M KH_2PO_4 / 0,72 M K_2HPO_4 (100 ml je 900 ml).

Zellsuspensionspuffer (36 ml/l Präparation):

50 mM Glucose	(12,5 ml einer 2 M Stocklösung)
25 mM Tris/HCl, pH 8,0	(12,5 ml einer 1 M Stocklösung)
10 mM EDTA	(10 ml einer 0,5 M Stocklösung)
ad 500 ml mit H_2O , autoklavieren oder sterilfiltrieren. Lagerung bei RT.	

Lysozymlösung (4 ml/l Präparation):

40 mg/ml Zellsuspensionspuffer

Lösung immer frisch ansetzen.

0,2 N NaOH/ 1% SDS (80 ml/l Präparation):

16 ml 1 N NaOH
8 ml 10 % SDS
ad 80 ml mit H₂O

Lösung immer frisch ansetzen.

5 M Kaliumacetat (40 ml/l Präparation):

3 M Kaliumacetat 294 g/l
2 M Essigsäure, 100 % 114,4 ml/l
in H₂O lösen. pH zwischen 4,8 und 5,2. Lagerung bei 4 °C.

Isopropanol p.A. (Firma Merck)

TE 10/10, pH 7,5 (15 ml/l Präparation):

10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 ml einer 1 M Stocklösung
10 mM EDTA 2 ml einer 0,5 M Stocklösung
ad 100 ml mit H₂O.

2 M Tris-base (5 ml/l Präparation):

24,2 g/100 ml H₂O

EtBr (1,4 ml/l Präparation) : 10 mg EtBr/ml H₂O

Cäsiumchlorid, optical grade (Firma BRL)

CsCl zum Austarieren: 10 g CsCl + 10 ml TE 10/10, pH 7,5

CsCl gesättigter iAmOH: CsCl in H₂O lösen und so lange iAmOH dazugeben, bis die Wasserphase gesättigt ist.

Dialysepuffer (ca. 5 l): 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
1 mM EDTA

3 M Natriumacetat, pH 7,5: in H₂O, pH mit Essigsäure/NaOH einstellen.

70 % EtOH p.A. in H₂O

TE 10/1, pH 7,5: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
1 mM EDTA

Am Vortag der Aufbearbeitung beimpft man aus einer antibiotikahaltigen Übernachtskultur in LB-Medium die Hauptkultur. Die Hauptkultur (1 l TB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotika) wird mit 1/500 bis 1/200 des Endvolumens mit der Vorkultur beimpft. Am nächsten Tag werden die Zellen im GS3-Rotor bei 7000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wird in 36 ml Zellsuspensionspuffer suspendiert. Nach der Zugabe von 4 ml Lysozymlösung und einer 10-minütigen Inkubation bei RT werden 80 ml NaOH/SDS-Lösung zugegeben, vorsichtig gemischt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend werden 40 ml kalte Kaliumacetatlösung untergerührt, für 15 Minuten auf Eis gestellt und währenddessen gut geschüttelt. Danach wird 5 Minuten bei 8000 rpm im GS3-Rotor

zentrifugiert. Die DNA verbleibt dabei im Überstand, der durch ein Kleenex-Tuch gegossen wird um ihn vollständig vom Pellet zu trennen. Zum Filtrat werden 0,6 Vol. Isopropanol gegeben, gemischt und 10 Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 1 l ml TE (10/10) gelöst und mit Tris-base neutralisiert. Anschließend wird das Volumen auf 13,4 ml mit TE (10/10) aufgefüllt und 1,4 ml Ethidiumbromidlösung zugegeben. Dieses Gemisch wird in ein Corex-Röhrchen mit 14,8 g CsCl überführt, bei 37 °C gelöst und für 10 Minuten bei 8000 rpm im SS34-Rotor zentrifugiert. Der Überstand wird in ein T160-Röhrchen gefüllt und bei 38000 rpm für 40 Stunden bei 18 °C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Anschließend wird die Plasmid-DNA mit einer Spritze abgezogen und in ein neues T160-Röhrchen überführt. Eine weitere Zentrifugation für 16 bis 20 Stunden bei 18 °C und 38000 rpm schließt sich an. Nach dem Abziehen der Bande wird das EtBr mit Hilfe von iAmOH extrahiert. Es wird 1 Vol. iAmOH zugegeben, gevortext und kurz stehengelassen bis sich zwei Phasen bilden. Die obere (durch das EtBr rosa gefärbte) Phase wird abgenommen und verworfen. Dies wird mehrmals wiederholt bis die Oberphase farblos ist. Anschließend dialysiert man die DNA gegen TE (10/1) für mindestens 3 Stunden oder über Nacht. Nach der Dialyse wird die DNA mit 2,5 Vol. EtOH abs. unter Zugabe von 1/10 Vol. 3 M NaAc gefällt. Nach zweimaligem Waschen mit 70 % EtOH wird das Pellet getrocknet und in sterilem TE (10/1) gelöst.

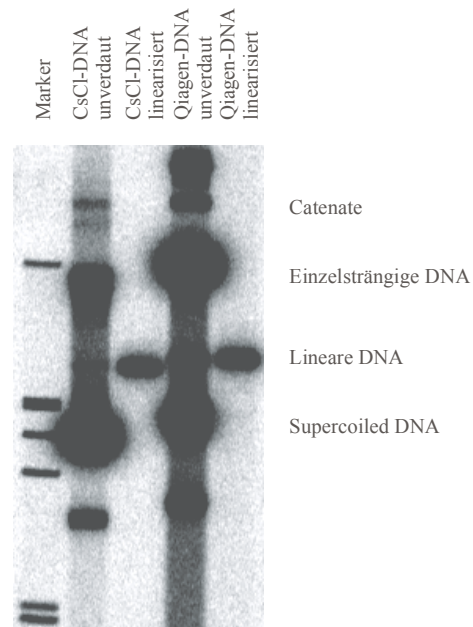


Abb. 4.1: Vergleich zwischen Plasmid-DNA, die mit CsCl-Gradienten bzw. nach dem Qiagen-Protokoll präpariert wurde.

Der Anteil an ‚supercoiled‘-DNA im Vergleich zu den weiteren Zuständen der DNA ist nach CsCl-Präparation höher als nach Qiagen-Präparation.

4.5.4. DNA-Rückgewinnung aus Gelen mit dem 'QIAquick' Gel Extraktions Kit

Das Prinzip der Extraktion beruht auf der DNA-Bindung an eine Silica-Membran in Gegenwart von Hochsalzpuffern, während Verunreinigungen aus der Säule ausgewaschen werden. Anschließend wird die DNA mit TE oder H₂O eluiert.

Die zu isolierende Bande wird aus dem Agarosegel ausgeschnitten und nach dem Protokoll des Herstellers Qiagen über eine Säule gereinigt.

4.5.5. Isolierung von hochmolekularer DNA aus Säugerzellen

Quick-DNA (nach Ramirez-Solis et al., 1995)

“Modified Bradleys”: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 2 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,5 % SDS, 1 mg/ml Proteinase K

Konfluent gewachsene Zellen einer 9,1 cm² Kulturplatte werden mit PBS gewaschen und mit 0,5 ml der Proteinase K-Lösung versetzt. Nach Überführen der Lösung in 1,5 ml Eppendorfgefäße inkubiert man über Nacht bei 55 °C. Anschließend wird die DNA durch vorsichtige Zugabe von 100 % Ethanol mit 75 mM NaAc ohne Schütteln 2-3 Stunden bei Raumtemperatur präzipitiert. Durch vorsichtiges Schwenken und einem anschließenden Zentrifugationsschritt für 5 Minuten bei 5000 UpM wird die DNA pelletiert. Danach erfolgen zwei Waschschriffe, bei denen das DNA-Pellet mit 0,5 ml 70 % Ethanol für 30 Minuten stehengelassen und anschließend wie beim ersten Mal abzentrifugiert wird. Nach dem zweiten Waschschriffe lässt man das DNA-Pellet für 10 Minuten bei Raumtemperatur trocknen und nimmt die DNA dann in 30 µl TE auf, so dass die DNA-Konzentration ca. 0,5 µg/µl beträgt. Die so erhaltene HMW-DNA kann direkt für den Restriktionsansatz und anschließende Southern Blot-Analysen eingesetzt werden, es empfiehlt sich der Einsatz von 8 µl DNA.

4.5.6. Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen nach dem „NucleoSpin RNA II“-Protokoll (Macherey-Nagel)

TEN: 40 mM Tris/HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA

Mindestens 1x10⁶ Zellen werden mehrfach mit PBS gewaschen und mit TEN geerntet. Nach dem Zentrifugieren (5 Minuten, 1000 UpM) kann das Pellet bei -70°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet werden.

Isolierung von Gesamt-RNA nach dem „NucleoSpin RNA II“-Protokoll (Macherey-Nagel):

Das Prinzip der Aufreinigung beruht auf Lyse des Zellpellets, Inaktivierung von RNasen und Bindung der RNA an eine Silica-Membran. DNA-Kontaminationen werden durch

DNaseI beseitigt. Nach dem Entfernen von Verunreinigungen durch Waschschr tte wird die RNA mit RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert.

4.6. DNA-Modifizierung

4.6.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die DNA in einer Konzentration von bis zu 1 µg/µl wird in dem vom Hersteller angegebenen Puffer bei der angegebenen Temperatur (zumeist 37 °C) gespalten. Zur Spaltung von Plasmid-DNA wird die 1-4-fache Menge an Enzymeinheiten (Units) eingesetzt. Die Zugabe des Enzyms sollte 10 % des Gesamtvolumens nicht  berschreiten, da sonst Sternaktivit ten auftreten können. Die gespaltenen Fragmente können im Weiteren für Klonierungen, Transfektionen oder radioaktive Markierungen eingesetzt werden.

4.6.2. Auffüllen von 5'-überstehenden Enden

10x Klenow-Puffer: 100 mM Tris/HCl, pH 8, 500 mM NaCl, 100 mM MgCl₂, 2 mM DTT

dNTP-Mix: dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 3 mM in Wasser

Für Klonierungszwecke kann es notwendig werden, die durch die Verwendung verschiedener Restriktionsenzyme entstandenen 5' kohäsiven Enden mit ‚Klenow‘-Enzym aufzufüllen um glatte Enden zu erzeugen. Zudem wird diese Klenow-Auffüllreaktion zur radioaktiven Markierung von Plasmid-DNA verwendet.

In einem Reaktionsansatz von 30 µl werden bis zu 1 µg gespaltene DNA mit 4 µl Nukleotid-Mix und 1-2 U des Klenow-Enzyms in 1x Klenow-Puffer bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Die Reaktion wird durch Phenol-Extraktion gestoppt und die DNA durch F llung gereinigt.

4.6.3. Dephosphorylierung

10x Phosphatasepuffer: 500 mM Tris/HCl, pH 9, 10 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂,
1 mM Spermidin

Um bei einer Ligation die Religation des Vektors zu verhindern, werden überstehende 5'- oder 3'-Enden der DNA-Fragmente mit alkalischer Phosphatase (*calf intestine phosphatase*, CIP) dephosphoryliert. Dazu werden in einem Reaktionsansatz von 100 µl Endvolumen 10 µl 10x Phosphatasepuffer und 20-100 pmol überstehende Enden mit 1-2 U Phosphatase für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 1 U Enzym

wird für weitere 30 min inkubiert und die Reaktion anschließend durch Hitzeinaktivierung gestoppt.

4.6.4. Ligation von DNA-Fragmenten zur Transformation

5x Ligasepuffer : 250 mM Tris/HCl, pH 7,6, 50 mM MgCl₂, 25% (w/v) PEG 8000, 5 mM ATP, 5 mM DTT

Ligation eines Inserts:

Bei der Ligation verknüpft die T4-DNA-Ligase DNA-Fragmente, die sowohl kompatible überstehende als auch glatte Enden besitzen können. Dabei erfolgt eine Phosphodiester-Bindung zwischen den 3'-OH- und den 5' Phosphatenden der DNA.

Ca. 20 fmol gespaltenen und u.U. dephosphorylierter Vektor wird mit ca. 60 fmol Insert in 20 µl mit 4 µl 5x Ligasepuffer und 2 U T4-DNA-Ligase für mindestens 4 Stunden oder über Nacht bei 16 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA gestoppt.

Für Klonierungen mit Oligonukleotiden werden 300 pmol beider Oligos zunächst in 10 µl Wasser gemischt. Der Ansatz wird bei 70°C 5 Minuten denaturiert, dann wird langsam auf 35 °C im Thermomixer abgekühlt. Zwischendurch erfolgen einige kurze Zentrifugationen. Die Ligation erfolgt unter Verwendung des gesamten Ansatzes mit gespaltenem Vektor wie beschrieben.

4.7. Charakterisierung von Nukleinsäuren

4.7.1. „Polymerase Chain Reaction“ (PCR)

(Saiki et al., 1988; Anwendungsbeispiele: Innis et al., 1990)

Die Polymerase Ketten Reaktion ist eine einfache aber effiziente Methode zur Vermehrung eines bestimmten DNA-Segments *in vitro* aus einem Gemisch unterschiedlichster DNA-Sequenzen (z.B. Plasmide, genomische DNA, cDNA-Präparationen). Dazu muss lediglich die Sequenz der Grenzen des Segments zum Design geeigneter Oligonukleotidprimer bekannt sein. Ein PCR-Zyklus besteht aus einer Reihe von aufeinanderfolgenden Inkubationsschritten bei unterschiedlichen Temperaturen: die doppelsträngige DNA wird zunächst bei einer hohen Temperatur denaturiert. Danach erfolgt bei einer niedrigen Temperatur die Bindung der Primer, die komplementär zu den jeweiligen 3'-Grenzen des Zielsegments sind. Diese werden anschließend durch eine DNA-Polymerase bei einer intermediären Temperatur verlängert. Die Verwendung von thermostabilen Polymerasen erlaubt die häufige Wiederholung dieses Zyklus ohne erneute Zugabe des Enzyms. In den

meisten Fällen verwendet man die sogenannte Taq-Polymerase von *Thermophilus aquaticus*.

Es gibt allerdings noch eine Reihe anderer möglicher Enzyme, die bei speziellen Anforderungen zum Einsatz kommen. So verwendet man zusätzlich Polymerasen mit „proofreading“ Aktivität, wenn die Fehlerquote in der Sequenz des Amplifikats sehr niedrig sein soll. Ein solches Korrekturleseenzym überprüft die von der Taq-Polymerase synthetisierten Sequenzen und verbessert eingebaute Fehler, was die Fehlerhäufigkeit auf 1/10 verringert. Mit einem solchen System können PCR-Produkte aus genomischer DNA bis zu einer Größe von 15 kb amplifiziert werden. Ein derartiges System findet in der Expand™ Long Template PCR (Roche Pharma) seine Anwendung. Hier wird die Pwo-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* als Korrekturleseenzym eingesetzt. Da während der PCR theoretisch bei jedem Zyklus die betreffende Sequenz verdoppelt wird, kommt es zu einem exponentiellen Anstieg ihrer Konzentration, so dass am Ende eine bis zu 10⁹-fache Vermehrung des gewünschten Fragments erreicht werden kann.

Ein typischer Reaktionsansatz wird in speziellen 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen folgendermaßen zusammengestellt:

2 µl 10x PCR-Puffer	13-22,5 mM MgCl ₂ , 500 mM Tris-HCl, pH 9,2 (25°C), 160 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
2 µl dNTP-Mix	je 5 mM aller vier Nukleotide (100 mM Stammlösungen; Pharmacia)
1,5 µl Primer A	15 pmol, Stammlösungen mit 100 pmol
1,5 µl Primer B	15 pmol, Stammlösungen mit 100 pmol
0,5 µl MgCl ₂	
11,5 µl H ₂ O	Millipore-Qualität

Die Gefäße werden dann in den PCR-Heizblock überführt. Ein Überschichten der Reaktionsvorlage mit Mineralöl ist nicht nötig, da die verwendete PCR-Maschine eine Deckelheizung besitzt. Die Bohrungen des Gerätes können leicht mit Mineralöl befeuchtet werden, um einen optimalen Temperaturübergang zu gewährleisten. Nach dem Initiationsschritt (s.u.) wird die Reaktion gestartet durch Zufügen von

0,375 µl Taq-/Pwo-Polymerase	1,3 U
0,5 µl 10x PCR-Puffer	
4,125 µl H ₂ O	

Ein typisches Temperaturprofil beginnt zunächst mit einem initialen DNA-Denaturierungsschritt (5 min, 94 °C). Dieser Schritt sollte nie ausgelassen werden, da die Anwesenheit der Polymerase bei niedrigeren Temperaturen bereits zu einer Verlängerung von fehlhybridisierenden Primern führt, die dann bei den folgenden Amplifikationszyklen als korrekte Templates benutzt werden und zu falschen Produkten führen. Danach wird auf

68 °C abgekühlt und die Polymerase hinzugefügt. Nun schließen sich die Temperaturzyklen an, die typischerweise 20- bis 25-mal wiederholt werden:

94 °C	30 s
60 °C – 66 °C	60 s
68 °C	120 - 300 s, je nach Länge des Templates

Zu diesem generalisierten Versuchsprotokoll müssen noch einige Anmerkungen gemacht werden, da eine erfolgreiche Versuchsdurchführung von vielen Parametern abhängig ist und häufig einer auf die jeweilige Anwendung bezogenen Optimierung bedarf:

Da sich die PCR-Methode zum Nachweis extrem geringer Konzentrationen spezifischer Sequenzen eignet, ist sie sehr anfällig gegen Kontaminationen mit anderen DNAs. Es muss daher auf möglichst langsames, aerosolfreies Pipettieren geachtet werden.

Die angegebenen Konzentrationen sollten sehr genau eingehalten werden. Es empfiehlt sich daher, zunächst eine Reaktionsstammlösung anzusetzen und diese dann auf die einzelnen Proben zu verteilen, um Pipettierfehler zu minimieren.

Die optimale Magnesiumkonzentration muss für jedes Primerpaar empirisch ermittelt werden. Ein Über- oder Unterschuss kann die Amplifikationseffizienz reduzieren oder zu unspezifischen Produkten führen.

Der Nukleotid-Mix sollte nur aus vorneutralisierten Stammlösungen der Firmen Pharmacia, Roche Pharma oder USB zusammengestellt werden.

Die einzelsträngigen Oligonukleotidprimer sollten 15 bis 30 bp lang sein und besonders an ihrem 3' -Ende keine Komplementarität zu sich selbst oder zueinander aufweisen. Für eine maximale Spezifität sollte der GC-Gehalt bei etwa 50 % liegen. Die Konzentration an Primern kann in dem angegebenen Bereich variieren; entscheidend ist, dass beide Primer im äquimolaren Verhältnis vorliegen. Dasselbe gilt für das Verhältnis der vier Nukleotide zueinander.

Die Dauer der einzelnen Schritte der Temperaturzyklen kann leicht verändert werden. Die Laufzeit des Elongationsschrittes richtet sich nach der Länge der zu amplifizierenden Sequenz. Man geht etwa von 1000 bp / min Synthesegeschwindigkeit aus. In vielen Fällen schließt man den Temperaturzyklen noch einen einzelnen Elongationsschritt von 7 bis 10 min bei 68 °C an, um ein Fertigstellen noch nicht beendeter Sequenzen zu ermöglichen.

4.7.2. Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen von Plasmid-DNA wurden von der Firma MWG durchgeführt. Pro Sequenzierungsreaktion ('Comfort Read') wurden mindestens 5 µg Plasmid wie in Kapitel 4.3.3 beschrieben gefällt, gewaschen und getrocknet.

4.8. Radioaktive Nachweismethoden

4.8.1. DNA-Markierung mit dem "Rediprime DNA Labelling System"

Labelling Mix (Fa. Amersham Life Science):

dATP, dGTP, dTTP, exonukleasefreies Klenow-Enzym, Oligonukleotidprimer (9mer).

25-50 ng DNA werden in einem Endvolumen von 45 µl in einem Eppendorfgefäß für fünf Minuten bei 100°C denaturiert und dann sofort auf Eis gestellt. Anschließend wird der Ansatz in den Labelling Mix pipettiert, nach Zugabe von 5 µl α -³²P-dCTP (3000 Ci/mmol) gemischt und für 10-60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Anschließend werden nicht eingebaute Nukleotide über eine Sephadex-Säule abgetrennt.

4.8.2. Klenow-Markierung

Zur Größenbestimmung von Fragmenten im Southern Blot wird ein mit ³⁵S-dATP markierter Größenmarker (Lambda-DNA, HindIII und EcoRI verdaut) eingesetzt. Dazu markiert man die verdaute λ-DNA durch eine Auffüll-Reaktion mit dem Klenow-Enzym. Man versetzt den Verdauungsansatz (ca. 1 µg DNA in einem Volumen von 20 µl) mit 2 µl Nukleotid-Mix, 4 µl α -³⁵S-dATP (>1000 Ci/mmol) und 2 U Klenow. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C und Abstoppen mit 20 µl Stop-Mix erfolgt die Aufreinigung über eine Sephadex G50 Säule.

4.8.3. „Southern Blotting“

(Southern, 1975)

10 µg der aufgereinigten, hochmolekularen DNA werden mit 2 µl des jeweiligen 10-fachen Restriktionspuffers, 0,5 µl TE/RNase (10 µg/ml) sowie 20 U des entsprechenden Restriktionsenzym versetzt und über Nacht im Gesamtvolumen von 20 µl bei der spezifischen Temperatur des Enzyms inkubiert. Danach wird die DNA direkt mit 5 µl 6x Probenpuffer versetzt und elektrophoretisch in einem 0,8 bis 1,2 %-igen TAE-Agarosegel aufgetrennt. Als Größenstandard wird ein mittels Klenow-Enzym ³⁵S-markierter Verdau von λ-DNA verwendet. Bei all diesen Schritten ist es wichtig, auf eine intensive Durchmischung der eingesetzten, teilweise viskosen Lösungen zu achten.

Der Transfer der DNA vom Gel auf die positiv geladene Nylonmembran erfolgt mit 0,4 M NaOH. Lange DNA-Fragmente (>5 kb) können vor dem Transfer mittels 0,25 M HCl (ca. 30 Minuten) depuriniert werden, so dass sie während des alkalischen Transfers in

Teilfragmente zerfallen und leichter aus dem Gel austreten können. Das Gel wird anschließend mit 0,4 M NaOH neutralisiert und in die Blotapparatur überführt: das Gel liegt mit der Unterseite nach oben oberhalb des Flüssigkeitsspiegels auf einem feuchten, exakt auf Gelbreite zugeschnittenen Filterpapierstreifen (Whatman 3MM), dessen gegenüberliegende Ränder in das Pufferreservoir (0,4 M NaOH) eintauchen. Unter dem Filterpapier sollten mehrere Lagen Filterpapier liegen, die nicht mit der Flüssigkeit in Berührung stehen. Auf das Gel wird die Nylonfolie gelegt, die zuvor in 0,4 M NaOH gewässert wurde. Luftblasen zwischen Gel und Membran sind sorgfältig zu entfernen. Auf die Membran werden zwei Lagen mit 0,4 M NaOH angefeuchtetes und eine Lage trockenes Filterpapier geschichtet. Nach oben schließt ein Stapel saugfähiges Papier (z.B. „Tork“) die Anordnung ab. Die Apparatur wird vorsichtig mit einer Glasplatte und einem Gewicht (ca. 500 g) beschwert. Der Transfer sollte mindestens 6 Stunden, meist jedoch über Nacht erfolgen. Bei Durchfeuchtung sollte der Papierstapel gewechselt werden. Anschließend wird die Nylonfolie in 2x SSC neutralisiert, 2 Stunden bei 80 °C gebacken und zur Hybridisierung weiterverwendet.

4.8.3.1. Hybridisierung und Waschen

Hybridisierung mit Dextransulfat-Hybridisierungslösung:

Hybridisierungslösung	in Aliquots à 20 ml bei –20°C aufbewahren	
	1 M NaCl	
	50 mM Tris, pH 7,5 (bei 37 °C)	
	10 % Dextransulfat	
	1 % SDS	
	250 µg/ml Salmon Sperm DNA (sonifiziert)	
Waschlösungen	2x SSC / 0,5 % SDS	oder
	1x SSC / 0,1 % SDS	

Prähybridisierung und Hybridisierung:

20 ml der Hybridisierungslösung werden bei 65 °C aufgetaut, für 10 Minuten aufgekocht und wieder auf 65 °C abgekühlt. Die Lösung wird in ein Glasröhrchen für den Hybridisierungsofen gefüllt und die mit H₂O angefeuchtete Membran mit der DNA-freien Seite an die Glaswand eingelegt. Die Prähybridisierung erfolgt bei 65 °C im Hybridisierungsofen für mindestens 1 Stunde. Die denaturierte radioaktiv markierte Probe wird hinzugefügt und die Hybridisierung erfolgt bei gleichen Bedingungen über Nacht. Die Oberfläche der Membran darf durch zu grobe Handhabung nicht verletzt werden, des

Weiteren sollten sich zwischen Membranrückseite und Glaswand keine Luftblasen befinden.

Waschen:

Der Röhrcheninhalt wird in den radioaktiven Abfall entleert und die Membran vorsichtig entnommen.

Waschschritte:

- | | | | |
|----|--------------------------------------|--------|-------|
| 1. | 2x SSC / 0,5 % SDS (ca. 250 ml) | 5 min | RT |
| 2. | 2x SSC / 0,5 % SDS (500 bis 1000 ml) | 30 min | 65 °C |
| 3. | 2x SSC / 0,5 % SDS (250 bis 500 ml) | 5 min | 65 °C |
- bei zu erwartendem schwachen Signal

oder

- | | | | |
|--|-------------------------------------|--------|-------|
| | 1x SSC / 0,1 % SDS (250 bis 500 ml) | 30 min | 65 °C |
|--|-------------------------------------|--------|-------|
- bei zu erwartendem starken Signal

Anschließend kann die Membran feucht in Klarsichtfolie eingeschlagen und exponiert werden. Trocknen der Membran führt zu irreversibler Bindung und macht nachträgliches Waschen und Rehybridisieren unmöglich.

Rehybridisierung:

Zur Rehybridisierung wird die Aktivität durch Waschen unter den für die benutzte Membran angegebenen 'Strip'-Bedingungen entfernt. Für die Hybond-XL Membran wird kochendes 0,5 %iges SDS in 0,1x SSC auf die Membran gegeben und bei Raumtemperatur geschüttelt, bis die Lösung abgekühlt ist. Die vollständige Ablösung der radioaktiven Probe wird durch anschließende Exposition sichergestellt. Erneute Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgen wie gehabt.

4.8.4. „Northern Blotting“

Das Formaldehyd-Agarosegel wird 5 Minuten in H₂O und anschließend zweimal 15 Minuten in 10x SSC geschwenkt. Danach erfolgt der Aufbau der Blotapparatur analog zum Southern Transfer, allerdings erfolgt der Transfer in diesem Fall mit 10x SSC über Nacht. Als Membran dient eine Nylonfolie (GeneScreenPlus, NEN), die vor Gebrauch kurz in H₂O angefeuchtet wird. Nach dem Transfer wird die Membran mehrfach in 2x SSC geschwenkt, zwischen zwei Lagen Whatman 3MM Papier luftgetrocknet und anschließend 2 Stunden bei 80 °C gebacken.

Hybridisierung und Waschen von Northern Blots

Hefe-RNA: 1 g in 100 ml H₂O lösen, bei 4°C lagern; zum Gebrauch wird die Hefe-RNA 10 Minuten auf 100 °C erhitzt und sofort in der Prähybridisierungslösung verdünnt (Endkonzentration 0,5 mg/ml).

Prähybridisierungslösung: 10 % Dextransulfat (2 ml 50 % Dextransulfat), 1 % SDS (0,5 ml 20 % SDS), 1 M NaCl, H₂O ad 9 ml; vor Gebrauch 0,5 ml denaturierte Carrier-DNA, sowie 0,5 ml denaturierte Hefe-RNA zufügen.

Hybridisierungslösung : ist die Prähybridisierungslösung, jedoch mit radioaktiv markierter Probe (ein Erneuern der Hybridisierungslösung ist unnötig); Probe vorher 10 Minuten auf 100 °C erhitzen und dann sofort in der Hybridisierungslösung verdünnen.

Prähybridisierung:

Die Prähybridisierung erfolgt analog zu der für DNA-Blots, wird jedoch bei 60 °C durchgeführt und sollte mindestens 20 Minuten dauern.

Hybridisierung:

Die Hybridisierung erfolgt bei 60 °C über mindestens 8 Stunden.

Waschen:

Nach dem Entfernen der Hybridisierungslösung wird die Nylonfolie zunächst innerhalb des Röhrchens kurz mit 2x SSC gewaschen und dann aus dem Röhrchen in eine Instrumentenschale überführt. Anschließend wird die Membran für 5 Minuten in 2x SSC und dann mindestens zweimal für 15 Minuten mit einer auf 60°C vorgewärmten Lösung von 2x SSC/1 % SDS gewaschen. Die Zahl der Waschschrte hängt von der mittels eines Handmonitors gemessenen Aktivität ab. Zum Abschluss erfolgt ein fünfminütiger Waschschrte mit 0,1x SSC. Der Blot wird nun in Klarsichtfolie eingeschlagen und exponiert.

4.9. Gelelektrophorese**4.9.1. Agarose Gelelektrophorese**

Laufpuffer (TAE): 40 mM Tris/Acetate (pH 7,5)
20 mM NaOAc, 1 mM EDTA

5x Stop-Puffer: 15 % Ficoll
50 mM EDTA
1x TAE
0,05 % Bromphenolblau
0,05 % Xylencyanol

Zur Anfertigung eines 1 %igen Standardgels wird 1 g Agarose in 100 ml Laufpuffer aufgenommen und in einem Mikrowellenherd so lange gekocht, bis keine sprudelnde Blasenbildung mehr zu beobachten ist. Dann wird die flüssige Agarose mit 1 µl Ethidiumbromid (5 mg/ml) vermischt und in eine Gelkammer gegossen. Zur Formung der Geltaschen wird ein Kamm eingesetzt. Nach dem Erstarren wird das Gel in eine mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt. Die Proben werden vor dem Auftragen mit $\frac{1}{5}$ Volumen des 5x Stop-Puffers versetzt. Für die Erkennung der Größe eines Fragments werden Größenstandards parallel mit aufgetragen. Die Elektrophorese wird bei ungefähr 100 V und 30 mA durchgeführt. Je nach Größe der Fragmente werden die DNA-Banden nach 0,5-3-stündiger Laufzeit fotografiert. Für eine präparative Gewinnung der DNA-Fragmente können die Banden unter UV-Licht (360 nm) aus dem Agarosegel ausgeschnitten werden. Zum Nachweis sehr kleiner DNA-Fragmente steht hochgereinigte NuSieveTM-Agarose zur Verfügung, die die Herstellung von 10 %igen Gelen mit einem Auflösungsvermögen von 20 bp-Fragmenten ermöglicht.

4.9.2. Formaldehyd-Agarosegele

10x MOPS: 0,2 M Morpholinopropansulfonsäure, 10 mM EDTA, 10mM NaOAc, pH 7

1,2 g Agarose werden in 72 ml H₂O durch Aufkochen gelöst und auf 55°C abgekühlt. Danach werden 10 ml 10x MOPS und 18 ml 37 %ige Formaldehydlösung hinzugefügt und gut gemischt. Anschließend wird die Lösung in einen Gelträger überführt und für mindestens 1 h polymerisiert. Die Elektrophorese wird bei 100V in 1x MOPS-Puffer durchgeführt. Als Größenstandard dient eine RNA-Leiter (0,24-9,5 kb, BRL).

4.10. Arbeiten mit eukaryontischen Zellkulturen

4.10.1. Verwendete Zellen

CHO-K1: Chinese Hamster Ovary (ATCC 9618-CRL)

4.10.2. Medien und Lösungen

PBS : 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄x2H₂O, 1,47 mM KH₂PO₄, pH 6,8 - 7,0 mit 1 N NaOH einstellen; bei 4°C lagern.

TEP : 6 mM EDTA, 0,1-0,2 % Trypsin (Fa. Gibco) in PBS

Penicillin/Streptomycinlösung (100x):

1,212 g Ampicillin/200 ml (10000 U/ml),

2 g Streptomycin/200 ml (10 mg/ml), zum Lösen mit NaOH auf pH 7,4 einstellen, bei -20°C lagern.

Medium für CHO-K1-Zellen:

Nut. Mix F-12 (HAM) mit Glutamax-1 (L-Alanyl-L-Glutamin), Fa. Gibco

Vor Gebrauch wird dem Medium 10 % FCS sowie 1/100 Volumen Penicillin/Streptomycin-lösung zugesetzt und gut gemischt.

4.10.3. Kultivierung von Zelllinien

Die Zellen werden bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem nassbegasteten Brutschrank kultiviert. Für die verwendeten Zelltypen werden die oben angegebenen Medien verwendet. Je nach Zelldichte sollte alle 2 bis 5 Tage das Medium gewechselt werden. Sind die Zellen konfluent, werden sie umgesetzt (passagiert).

4.10.4. Passagieren

Die zu passagierenden Zellen werden vom Medium befreit und mit PBS gewaschen. Das PBS wird abgesaugt und die Zellen mit einem dünnen Film TEP überschichtet. Nach einigen Minuten lösen sich die Zellen von der Oberfläche. Die Zellsuspension wird zur Inaktivierung des Trypsins in mindestens der doppelten Menge serumhaltigen Mediums aufgenommen. Noch lose auf dem Boden des Kulturgefäßes haftende Zellen werden mit Hilfe einer Pipette abgespült. Ein Aliquot der Zellsuspension wird gezählt und die Zellen in der gewünschten Konzentration in einem neuen Kulturgefäß mit frischem Medium ausgesät.

4.10.5. Langzeitlagerung von Zellen

Logarithmisch wachsende Zellen einer kleinen Flasche (ca. 3×10^6 Zellen) werden mit PBS gewaschen und mit 1 ml TEP abgelöst. Man nimmt die Zellsuspension in 4 ml Medium auf und zentrifugiert 5 Minuten bei 1000 UpM (Hettich Rotanta/S). Der Überstand wird abgesaugt, die Zellen werden in 2 ml kaltem FCS mit 5,6 % DMSO aufgenommen, auf 3 bis 4 Einfrierröhrchen (Bio-Freeze-Vials, Fa. Costar) aliquotiert und sofort auf Eis gestellt.

Man belässt die Röhrchen maximal 60 Minuten auf Eis, verpackt sie in Zellstoff und lagert sie in Styroporkästen bei -70°C. Nach ca. 12 Stunden können sie in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Um die Zellen möglichst wenig Stress im Verlauf des Einfrierprozesses auszusetzen, wurde eine Einfrierbox der Firma Nalgene (Nalgene® Cryo, 1 °C Freezing Container) verwendet. Hierbei werden die Zellen nach dem Überführen in die Einfrierröhrchen in die

Vertiefungen der Einfrierbox gestellt und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Dabei kommt es durch das Isopropanol zu einem stufenweisen Herunterkühlen der Zellen in 1°C -Schritten.

Das Auftauen der Zellen sollte möglichst schnell erfolgen. Dazu erwärmt man die Röhrchen im $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Wasserbad und nimmt die Zellsuspension in 10 ml Medium auf, um das DMSO zu verdünnen. Die Zellsuspension wird 5 Minuten bei 1000 UpM zentrifugiert, das Zellpellet in 5 ml frischem Medium aufgenommen und in eine kleine Flasche überführt.

4.10.6. Gentransfermethoden

4.10.6.1. Transfektion mittels „GenePORTERTM2 Transfection Reagent“ (Peqlab)

Vier Stunden vor der Transfektion erfolgt ein Mediumwechsel mit serumfreiem Medium. Für die Transfektion von 5×10^4 Zellen auf einer 6-Loch-Zellkulturplatte wird 1 μg DNA mit ‘DNA diluent’ auf ein Volumen von 50 μl verdünnt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stengelassen. In einem anderen Gefäß werden 10 μl des GenePORTERTM2 -Reagenz mit 40 μl serumfreiem Medium gemischt. Die DNA-Lösung wird vorsichtig zu der GenePORTERTM2 -Lösung gegeben. Es wird nicht gevortext. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wird die Mischung vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Am nächsten Tag erfolgt ein Mediumwechsel.

4.10.6.2. Transfektion mittels Elektroporation

Je nach Elektroporationsansatz wird das zu transfizierende Plasmid zuerst linearisiert oder zirkulär verwendet. Logarithmisch wachsende, halbkongruente Zellen werden mit TEP abgelöst, gezählt und in serumfreiem Medium in einer Konzentration von 3×10^5 Zellen pro 700 μl aufgenommen. Diese 700 μl Zellsuspension werden in ein steriles Röhrchen gegeben und mit der nötigen Menge (meist 5 μg) Plasmid vermischt. Anschließend wird der Ansatz in 0,4 cm sterile Plastikkuvetten pipettiert, die Kuvette in die Elektroporationskammer gestellt und die vorher ausgetestete, optimale Spannung und Stromstärke angelegt. Die normalen Bedingungen für CHO-K1-Zellen sind 800 μF und 360 V/cm. Die behandelten Zellen werden umgehend mit Kulturmedium verdünnt und ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgt der erste Medienwechsel und ggf. dann oder nach 48 Stunden die Zugabe des Selektionsmediums.

4.10.7. Durchführung einer Selektion

In der Regel wird das Medium einen Tag nach der Transfektion bzw. Elektroporation gewechselt. Dabei werden die Zellen mit dem entsprechenden Selektionsmedium versetzt, das alle 2-3 Tage erneuert wird. Klone erscheinen je nach Selektion und Zelltyp 8-12 Tage später. Die Klone werden, wenn sie Stecknadelkopfgröße erreicht haben, auf der Plattenrückseite mit Hilfe eines Filzstifts markiert, gezählt und die Zählung unter dem Mikroskop kontrolliert. Anschließend können Klone isoliert, als Mischung weiterverwendet oder subkloniert werden. Die zur Selektion verwendeten Drogenkonzentrationen sind vom Zelltyp abhängig und müssen vorher ausgetestet werden.

CHO-K1-Zellen: 500 µg/ml G418,
 5 µg/ml Puromycin

4.11. Proteinanalytik

4.11.1. Nachweis von GFP

4.11.1.1. ... im Fluoreszenzmikroskop

Zellklone oder Gemische können ohne Vorbehandlung auf dem Kulturgefäß unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Das GFP-Protein weist bei einer Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 489 nm eine Eigenfluoreszenz einer Wellenlänge von 508 nm auf und gibt GFP-exprimierenden Zellen ein grünes Erscheinungsbild. Nach einer solchen Analyse können z.B. GFP-exprimierende Klone isoliert werden.

4.11.1.2. ... im FACS

EPICS: PBS, 10 % FCS
Gentamycin: Stock (10 mg/ml), im Medium 5 µl/ml
Propidiumiodid

Die Eigenfluoreszenz des GFP-Proteins erlaubt die Lebendanalyse der Expressionshöhe einzelner Zellen. Hierzu müssen nicht konfluente Zellen abtrypsinisiert und im EPICS-Puffer aufgenommen werden. Die Zellsuspension wird 5 Minuten bei 1000 UpM abzentrifugiert und die Zellen werden anschließend in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml in EPICS-Puffer aufgenommen. Die Zellen können so etwa eine halbe Stunde auf Eis ohne Schaden überstehen. Für eine Sortierung empfiehlt sich die Vereinzelung der Zellen, indem man die Zellsuspension durch eine feine Gaze laufen lässt. Damit nur

lebende Zellen sortiert werden, wird Propidiumiodid zur Anfärbung toter Zellen in die Zellsuspension gegeben (2 μ M). Das GFP-Protein weist bei einer Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm eine Eigenfluoreszenz auf. Sortierte Zellen sollte vier Tage in Gentamycin-haltigem Medium kultiviert werden.

4.11.2. Nachweis von DsRed im FACS

Die Eigenfluoreszenz des Rot-fluoreszierenden Proteins wird analog zur GFP-Messung im FACS durchgeführt. Das Anregungsmaximum liegt bei 558 nm, allerdings kann zur Anregung auch ebenso wie bei GFP Licht einer Wellenlänge von 489 nm benutzt werden, während das emittierte Licht eine Wellenlänge von 583 nm besitzt.

4.11.3. IgG-Nachweis durch ELISA („Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay“)

Antikörper: *Coating-Antikörper:* Anti-Human IgG (Fab-spezifisch),
Firma Sigma, Produkt-Nr.: I 5260
Standard: Human IgG1, Kappa,
Firma Sigma. Produkt-Nr.: I 3889
Zweiter Antikörper: Goat-Anti-Human IgG (H+L),
Peroxidase gekoppelt

Chemikalien:

Carbonat-Puffer (50 ml):	16 ml 0,2 M Na ₂ CO ₃ (M=105,99 g/mol)	
	34 ml 0,2 M NaHCO ₃ (M=84 g/mol)	
10x TBS:	80 g NaCl	
	2 g KCl	
	61 g Tris	
	ad 1000 ml H ₂ O, pH 7,4 mit HCl	
T-TBS:	1x TBS + 0,05 % Tween 20	
Block-Puffer:	1x T-TBS + 3 % Gelatine	
Inkubations-Puffer:	1x T-TBS + 1 % Gelatine	
Farbreaktionsmix:	0,2 M Na ₂ HPO ₄	2,53 ml
	0,1 M Citricacid	2,47 ml
	H ₂ O	5,0 ml
	o-Phenaldiamindihydrochlorid	4,0 mg
	36 % H ₂ O ₂	1,2 μ l

Probenvorbereitung:

Der Zellüberstand wird nach 24-stündiger Inkubation einer nicht konfluenten 6-Loch-Platte abgenommen und anschließend die Zellzahl der 6-Loch-Platte bestimmt.

Der Zellüberstand wird nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 10.000 rpm in ein neues Reaktionsgefäß überführt und direkt für den ELISA verwendet oder bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

ELISA:

Mikrotiterplatten werden mit 100 µl pro Loch mit anti-human IgG (Fab-specific, Sigma Verdünnung 1:5.000 in Carbonatpuffer) über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wird die Platte 3x mit je 100 µl T-TBS gewaschen und für 30 min bei Raumtemperatur mit je 100 µl Block-Puffer inkubiert. Der Standard-Antikörper wird 1:10.000 in Inkubations-Puffer verdünnt, so dass eine Konzentration von 100 ng IgG/ml im ersten Loch erreicht wird. 200 µl vom Standard bzw. von jeder Probe werden in die erste Reihe der Mikrotiterplatte vorgelegt, um eine 1:2 Verdünnung der Proben durch mischen mit Inkubations-Puffer in jedem folgenden Loch zu erreichen. Anschließend wird eine Inkubation für mindestens zwei Stunden oder auch über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Platte wird 3x mit je 100 µl T-TBS gewaschen und für eine Stunde mit 100 µl Peroxidase-gekoppeltem Antikörper, der 1:5.000 in Inkubations-Puffer verdünnt wurde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Zwei Waschschrte mit T-TBS und TBS schließen sich an, bevor in jede Vertiefung 100 µl des Farbreaktionsmixes gegeben werden. Die Reaktion wird mit 100 µl 1N H₂SO₄ abgestoppt und die Platte im Elisa-Reader bei 492 nm vermessen. Die Probenkonzentration kann im Verhältnis zur Standardkonzentration berechnet werden.

4.11.4. Intrazelluläre Antikörperfärbung und Nachweis im FACS

Antikörper: Anti-Human IgG (H+L), FITC gekoppelt (Sigma-A1812)

Chemikalien:

2 %-ige Paraformaldehydlösung: 1 g Paraformaldehyd wird in 25 ml H₂O bei 65 °C für mindestens zwei Stunden oder über Nacht gerührt. Die Einstellung des pH-Wertes auf pH 7,4 erfolgt mit NaOH. Anschließend werden 5 ml 10x PBS und soviel H₂O zugegeben, bis ein Volumen von 50 ml erreicht ist. Die Haltbarkeit dieser Lösung liegt bei 2 bis 3 Tagen.

0,5 % Saponin/PBS: 500 mg Saponin Pulver (Sigma) werden in 100 ml 1x PBS gelöst.

Färbung:

Die Zellen einer kleinen Flasche werden mit PBS gewaschen und mit TEP abgelöst. 2×10^6 Zellen werden in 50 µl Medium in ein Loch einer Mikrotiterplatte (U-Form) überführt. Anschließend erfolgt ein Waschvorgang zur Entfernung von Proteinen wie folgt:

100 µl 1x PBS pro Loch

5 min bei 800 Upm zentrifugieren

Platte ausschlagen und kurz vortexen

Die Zellen werden zur Fixierung in 100 µl 2 %-iger Paraformaldehydlösung resuspendiert und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zweimal gewaschen. Eine Resuspendierung erfolgt in 100 µl 0,5 % Saponin/PBS mit 50 µl spezifischem Antikörper (verdünnt in 0,5 % Saponin/PBS). Nach 45 min Inkubation auf Eis wird ungebundener Antikörper durch zweimaliges Waschen mit 0,5 % Saponin/PBS entfernt. Anschließend wird durch einen FACS-Puffer (1x PBS/2 % FCS) das Saponin ausgewaschen (2x). Eine FACS-Analyse der intrazellulären Antikörper kann ohne die Zugabe von Propidiumjodid wie unter Kapitel 4.11.1.2 beschrieben durchgeführt werden.

4.12. Primer

<i>neofwd2</i>	5' - GCC CTG AAT GAA CTG CAA GAC G - 3'
<i>neorev2</i>	5' - GTC ATA GCC GAA TAG CCT CTC C - 3'
<i>sarfwd</i>	5' - CAG CTA TCT GTG CTG TCG CCT A - 3'
<i>sarrev</i>	5' - CTC ATG TCT CCT TGG GTT CCT C - 3'
<i>cmvfwd</i>	5' - GCC TGG CAT TAT GCC CAG TAC A - 3'
<i>cmvrev</i>	5' - GCC AAG TGG GCA GTT TAC CGT A - 3'
<i>gfpfwd1</i>	5' - ATC GAG CTG AAG GGC ATC GAC T - 3'
<i>gfprev1</i>	5' - CCG GTG GTG CAG ATG AAC TTC A - 3'
<i>heavyup</i>	5' - TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC G - 3'
<i>heavydown</i>	5' - GAG AGG CTC TTC TGC GTG TAG T - 3'
<i>lightup</i>	5' - CTG CAA GAC AGT CCT CCC TCA A - 3'
<i>lightdown</i>	5' - AAG CAA GTC TCT CCT ACC ACG G - 3'
<i>exfrt</i>	5' - GAG CTT GAA GTT CCT ATA C - 3'
<i>exsar</i>	5' - AGT GGA ACA TTC TTT CCC A - 3'
<i>exneo</i>	5' - CTG TCT CTT GAT CGA TCT T - 3'

4.13. Vektoren

pEpi-1	<p>Das 2,0 kb -große S/MAR-Element E aus pTZE20 wurde über die Restriktionsschnittstellen EcoRI/BglII in den Klonierungsvektor pGFP-C1 (Clontech, Acc#: U19280) eingebracht (Quelle: Piechaczek, Witten).</p> <p><i>[cmv-Promotor]-[GFP]-[S/MAR E]-[SV40 polyA]-[SV40 ori/Promotor]-[neo^r/kana^r]</i></p>
pEpi-eGFP	<p>Austausch des GFP-Gens in pEpi-1 durch eGFP aus dem Vektor peGFP-C1 (Clontech, Acc#: U055763).</p> <p><i>[cmv-Promotor]-[eGFP]-[S/MAR E]-[SV40 polyA]-[SV40 ori/Promotor]-[neo^r/kana^r]</i></p>
pGFP-C1Δ	<p>Deletion der Multiplen Klonierungsstelle des Vektors pGFP-C1 (Clontech).</p> <p><i>[cmv-Promotor]-[GFP]-[SV40 polyA]-[SV40 ori/Promotor]-[neo^r/kana^r]</i></p>
pL1eGFP1L	<p>Quelle: S. Fiering.</p> <p><i>[loxP]-[cmv-Promotor]-[eGFP]-[SV40 polyA]-[loxP]-[amp^r]</i></p>
pL1eGFPΔpA1L	<p>Deletion der Polyadenylierungsstelle im Vektor pL1eGFP1L. Zunächst wurde die BglII-Schnittstelle zwischen cmv-Promotor und eGFP-Gen mittels NheI/SacII entfernt. Somit konnte die SV40-Polyadenylierungsstelle unter Verwendung der Restriktionsenzyme BglII und XmaIII deletiert werden.</p> <p><i>[loxP]-[cmv-Promotor]-[eGFP]-[loxP]-[amp^r]</i></p>
pIA-I	<p>Die Transkriptionseinheit des Vektors pEpi-1, bestehend aus cmv-Promotor und eGFP-Gen, wurde mittels des Restriktionsenzym VspI deletiert und anschließend in der inversen Orientierung in die gleiche Schnittstelle inseriert. (Quelle: Stehle, Witten)</p> <p><i>[eGFP]-[cmv-Promotor]-[S/MAR E]-[SV40 polyA]-[SV40 ori/Promotor]-[neo^r/kana^r]</i></p>

- pEpi-L1CGΔpA1L** Austausch der Transkriptionseinheit des Vektors pEpi-eGFP durch Deletion mit BglII/BspLu11I und auffüllen der Schnittstellen mit Klenow-Enzym. Das 2,0 kb -große PvuII-Fragment aus pL1eGFPΔpA1L, welches die von loxP-sites flankierte Transkriptionseinheit bestehend aus cmv-Promotor und eGFP-Gen enthält, wurde dann mit dem pEpi-eGFP-Fragment ligiert.
[loxP]-[cmv-Promotor]-[eGFP]-[loxP]-[S/MAR E]-[SV40 polyA]-[SV40 ori/Promotor]-[neo^r/kana^r]
- pFRToli-neo** Ein 2,7 kb -großes Fragment, welches die neo^r/kana^r-Kassette enthält, wurde aus dem Vektor pEpi-eGFP mit den Enzymen NheI/StuI ausgeschnitten und in die SnaBI-Schnittstelle des Vektors pFRToli (Quelle: Seibler, J.) eingebracht.
[FRT]-[neo^r]-[cmv-Promotor]-[FRT]-[amp^r]
- pEpi-FGSARF** Die 5'-vom neo^r-Gen gelegene FRT-site des Vektors pFRToli-neo wurde mittels HindII/RsrII in das 6,0 kb -große StuI/RsrII-Fragment des Vektors pEpi-eGFP inseriert. Die 3'-vom cmv-Promotor gelegene FRT-site im pFRToli-neo wurde durch BspLu11I/NheI exzisiert und in das 6,2 kb -große BspLu11I/NheI-Fragment des pEpi-eGFP+FRT5' inseriert.
[FRT]-[eGFP]-[S/MAR]-[SV40 polyA]-[SV40 ori/Promotor]-[FRT]-[neo^r/kana^r]-[cmv-Promotor]
- pEpi-K** Austausch des eGFP-Gens im Vektors pEpi-eGFP durch eine 2,0 kb -große IgG (leichte Kette) -Sequenz über die Schnittstellen SnaBI/BamHI (Quelle: Baiker, Witten).
[cmv-Promotor]-[leichte Kette]-[S/MAR E]-[SV40 polyA]-[SV40 ori/Promotor]-[neo^r/kana^r]
- pEpi-H** Austausch des eGFP-Gens im Vektors pEpi-eGFP durch eine 2,8 kb -große IgG (schwere Kette) -Sequenz über die Schnittstellen SnaBI/BamHI (Quelle: Baiker Witten).
[cmv-Promotor]-[schwere Kette]-[S/MAR E]-[SV40 polyA]-[SV40 ori/Promotor]-[neo^r/kana^r]

pEpi-HK	<p>Inserierung der Transkriptionseinheit, bestehend aus cmv-Promotor und schwerer IgG-Kette in den Vektor pEpi-K über die SnaBI-Schnittstelle (Quelle: Baiker, Witten).</p> <p><i>[cmv-Promotor]-[leichte Kette]-[cmv-Promotor]-[schwere Kette]-[S/MAR E]-[SV40 polyA]-[SV40 ori/Promotor]-[neo^r/kand^r]</i></p>
pPur	<p>Clontech GenBank Accession #: U07648</p> <p><i>[SV40 ori/Promotor]-[puro^r]-[SV40 polyA]-[amp^r]</i></p>
pEpi-HP	<p>Das <i>puro^r</i>- und das <i>amp^r</i>-Gen wurden mittels BspLu11I/PvuII aus dem Vektor pPur ausgeschnitten und das entstandene 4,0 kb-Fragment mit dem Vektor pEpi-H, dessen <i>neo^r/kand^r</i>-Kassette ebenfalls durch die Verwendung der Enzyme BspLu11I/PvuII deletiert wurde, ligiert.</p> <p><i>[cmv-Promotor]-[schwere Kette]-[S/MAR E]-[SV40 polyA]-[SV40 ori/Promotor]-[puro^r]-[amp^r]</i></p>
pCrePac	<p>Cre-Rekombinasevektor, (Quelle: Taniguchi et al., 1998)</p> <p><i>[MC1-Promotor]-[Cre-Rekombinase]-[PGK-Promotor]-[puro^r]</i></p>
pFlpe	<p>Flp-Rekombinasevektor (Quelle: Stewart, F. EMBL)</p> <p><i>[CAGGS-Promotor]-[Flp-Rekombinase]-[IRES-Element]-[puro^r]-[amp^r]</i></p>
pFRFus	<p>Flp-Rekombinasevektor (Quelle: Baer, 2002)</p> <p><i>[SV40-Promotor]-[neo^r/kand^r]-[cmv-Promotor]-[Flp-Rekombinase/Rot Fluoreszierendes Protein]</i></p>

5. Abkürzungen

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
<i>amp</i>	Ampicillinresistenz-Gen
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BUR	<i>Base Unpairing Region</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CHO-K1	<i>Chinese hamster ovary</i> -Zellen
cm	Zentimeter
cmv	Cytomegalovirus-Promotor
cpm	Radioaktive Zerfälle pro Minute
Cre	<i>Causes recombination</i> (Cre-Rekombinase)
CTCF	CCCTC-binding factor
d.h.	das heißt
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat (N steht für Adenosin, Cytidin, Guanosin und Thymidin)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNaseI	Desoxyribonuklease I
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced Green Fluorescent Protein</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ES	Embryonale Stammzellen der Maus

Fa.	Firma
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FCS	fetales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
Flp	Flp-Rekombinase
Flpe	Flp-Rekombinase <i>enhanced</i>
FRT	<i>FLP-recognition-target</i>
g	Gramm
G	Guanin
G418	Aminoglycosid-2'-Deoxystreptin (Gentamycin-Derivat)
Ganc	Ganciclovir
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HMW-DNA	<i>High Molecular Weight-DNA</i>
HS	DNase I hypersensitive Site
HSV-TK	Herpes simplex virus Thymidinkinase
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>
kana	Kanamycin
kb	1000 Basenpaare
kDa	1000 Dalton
kV	1000 Volt
l	Liter
LCR	<i>Locus Control Region</i>
LIS	Lithium-3',5'-diiodosalicylat
loxP	<i>locus of crossing over</i> (Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase)
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>

M	molar
mA	Milliampère
MAR	<i>Matrix Attachment Region</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger-RNA
nm	10 ⁻⁹ Meter
neo	Neomycin-Phosphotransferase
Ω	Ohm
OD	optische Dichte
Ori	<i>Origin of replication</i>
P	Plasmid
pA	Polyadenylierungssignal
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PEV	<i>Position Effect Variegation</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
pmol	10 ⁻¹² Mol
RMCE	<i>Recombinase-Mediated Cassette Exchange</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur

S	Schwefel
SAR	<i>Scaffold Attachment Region</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIDD	<i>stress induced duplex destabilization</i>
S/MAR	<i>Scaffold/Matrix Attachment Region</i>
sec	Sekunde
SV40	Simian Virus 40
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
U	<i>Units</i> , Einheit zur Kennzeichnung von Enzymaktivitäten
UE	<i>Unpairing Elements</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen/Volumen (Volumenprozent)
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen (Gewichtsprozent)
z.B.	zum Beispiel

6. Literatur

Ahmad, K. and Golic, K.G. (1996). Somatic reversion of chromosomal position effects in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **144**: 657-670.

Aihara, H and Miyazaki, J. (1998). Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. *Nat Biotechnol.* **16**: 867-870.

Aiyar, A., Tyree, C. und Sugden, B. (1998). The plasmid replicon of EBV consists of multiple cis-acting elements that facilitate DNA synthesis by the cell and a viral maintenance element. *EMBO J.* **17**: 6394-6403.

Amati, B. and Gasser, S.M. (1990). Nuclear scaffold-attached regions bind nuclear scaffolds and can function as ARS elements in both budding and fission yeasts. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 5442-5454.

Anderson, J.N. (1986). Detection, sequence patterns and function of unusual DNA structures. *Nucleic Acids Res.* **14**: 8513-8533.

Ascenzioni, F., Donini, P. und Lipps, H.J. (1997). Mammalian artificial chromosomes-vectors for somatic gene therapy. *Cancer Letters* **118**: 135-142.

Auriche, C., Donini, P. and Ascenzioni, F. (2001). Molecular and cytological analysis of a 5.5 Mb minichromosome. *EMBO Rep.* **2**: 102-107.

Baer, A., Schübeler, D. and Bode, J. (2000). Transcriptional properties of genomic transgene integration sites marked by electroporation or retroviral infection. *Biochemistry* **39**: 7041-7049.

Baer, A. (2002). Funktioneller Vergleich von S/MARs (,scaffold/matrix attachment regions') und Insulatoren im chromosomalen Kontext. Dissertation. Technische Universität Braunschweig.

Baiker, A. (2000). Konstruktion episomal replizierender Vektoren für Säugetierzellen und Untersuchung ihrer mitotischen Stabilität. Dissertation. Universität Witten/Herdecke.

Baiker, A., Maercker, C., Piechaczek, C., Schmidt, S.B.A., Bode, J., Benham, C. und Lipps, H.J. (2000). Mitotic stability of a human scaffold/matrix attached region containing episomal vectors is provided by association with nuclear matrix. *Nat. Cell Biol.* **2**: 182-184.

Ballestas, M.E., Chatis, P.A. und Kaye, K.M. (1999). Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA is mediated by latency-associated nuclear antigen. *Science* **284**: 641-644.

Bell, S.P. and Dutta, A. (2002). DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem.* **71**: 333-374.

Benham, F., Hart, K., Crolla, J., Bobrow, M., Francavilla, M. and Goodfellow, P.N. (1989). A method for generation hybrids containing non-selected fragments of human chromosomes. *Genomics* **4**: 509-517.

Benham, C., Kohwi-Shigematsu, T. and Bode, J. (1997). Stress-induced duplex DNA destabilization in scaffold/matrix attachment regions. *J. Mol. Biol.* **274**: 181-196.

Berezney, R. and Coffey, D. S. (1974). Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **60**: 1410-1417.

Bestor, T.H. (1990). DNA methylation: evolution of a bacterial immune function into a regulator of gene expression and genome structure in higher eukaryotes. *Philos. Trans R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **326**: 179-187.

Bestor, T. (1998). Methylation meets acetylation. *Nature.* **393**: 311-312.

Bingham, P. M. (1997). Cosuppression comes to the animals. *Cell* **90**: 385-387.

Bode, J., Pucher, H. J. and Maaß, K. (1986). Chromatin structure and induction-dependent conformational changes of human interferon- β genes in a mouse host cell. *Eur. J. Biochem.* **158**: 393-401.

Bode, J. and Maaß, K. (1988). Chromatin domain surrounding the human interferon-beta gene as defined by scaffold-attached regions. *Biochemistry* **27**: 4706-4711.

Bode, J., Kohwi, Y., Dickinson, L., Joh ,T., Klehr, D., Mielke, C. and Kohwi-Shigematsu, T. (1992). Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix-associating DNAs. *Science* **255**: 195-197.

Bode, J., Schlake, T., Rios-Ramirez, M., Mielke, C., Stengert, M., Kay, V., and Klehr-Wirth, D. (1995). Scaffold matrix-attached regions: Structural properties creating transcriptionally active loci. *Int. Rev. Cytol.* **162**: 389-454.

Bode, J., Stengert-Iber, M., Kay, V., Schlake, T. and Dietz-Pfeilstetter, A. (1996). Scaffold/matrix-attached regions: Topological switches with multiple regulatory functions. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **6**: 115-138.

Bode, J., Bartsch, J., Boulikas, T., Iber, M., Mielke, C., Schübeler, D., Seibler, J., and Benham, C. (1998). Transcription-promoting genomic sites in mammalia: their elucidation and architectural principles. *Gene Therapy and Molecular Biology* **1**: 551-580.

Bode, J., Benham, C., Knopp, A., and Mielke, C. (2000a). Transcriptional augmentation: modulation of gene expression by scaffold/matrix-attached regions (S/MAR elements). *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **10**: 73-90.

Bode, J., Benham, C., Ernst, E., Knopp, A., Marschalek, R., Strick, R., and Strissel, P. (2000b). Fatal connections: When DNA ends meet on the nuclear matrix. *J. Cell. Biochem. Supplement* **35**: 3-22.

Bode, J., Schlake, T., Iber, M., Schübeler, D., Seibler, J., Snezhkov, E. and Nikolaev, L. (2000c). The transgeneticist's toolbox: novel methods for the targeted modification of eukaryotic genomes. *Biol. Chem.* **381**: 801-813.

Bode, J., Fetzer, C., Nehlsen, K., Scinteie, M., Hinrich, B.H., Baiker, A., Piechaczek, C., Benham, C. and Lipps, H.J. (2001). The hitchhiking principle. Optimizing episomal vectors for the use in gene therapy and biotechnology. *Int. J. Gene Ther. Mol. Biol.* **6**: 33-46.

Bode, J., Goetze, S., Ernst, E., Huesemann, Y., Baer, A., Seibler, J., Mielke, C. (2003). Architecture and utilization of highly-expressed genomic sites in "New Comprehensive Biochemistry 38". Chap 20: 551-572.

Bonifacino, J.S., Cosson, P., Shah, N. and Klausner, R.D. (1991). Role of potentially charged transmembrane residues in targeting proteins for retention and degradation within the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **10**: 2783-2793.

Bonifer, C., Yannoutsos, N., Kruger, G., Grosveld, F. and Sippel, A.E. (1994). Dissection of the locus control function located on the chicken lysozyme gene domain in transgenic mice. *Nucl. Acids Res.* **22**: 4202-4210.

Boulikas, T. (1995). Chromatin domains and prediction of MAR-Sequences. *Int. Rev. Cytol.* **162**: 279-288.

Brigham, K.L., Meyrick, B., Christman, B., Berry, L.C. Jr. and King, G. (1989). Expression of a prokaryotic gene in cultured lung endothelial cells after lipofection with a plasmid vector. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **1**: 95-100.

Broach, R.J. and Hicks B.J. (1980). Replication and recombination functions associated with the yeast plasmid, 2 μ circle. *Cell* **21**: 501-501.

Brylawski, B.P., Cohen, S.M., Cordeiro-Stone, M., Schell, M.J. and Kaufman, D.G. (2000). On the relationship of matrix association and DNA replication. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **10**: 91-99.

Buchholz, F., Angrand, P.O. and Stewart, A.F. (1998). Improved properties of Flp recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nat. Biotechnol.* **16**: 657-662.

Burdon, R.H., Qureshi, M. and Adams, R.L.P. (1985). Nuclear matrix-associated DNA methylase. *Biochem. Biophys. Acta* **825**: 70-79.

Calos, M.P. (1998). Stability without a centromere. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 4084-4085.

Carri, M.T., Micheli, G., Graziano, E., Pace, T. and Buongiorno-Nardelli, M. (1986). The relationship between chromosomal origins of replication and the nuclear matrix during the cell cycle. *Exp. Cell. Res.* **164**: 426-436.

Chen, M.R., Tsai, C.H., Wu, F.F., Kan, S.H., Yang, C.S. und Chen, J.Y. (1999). The major immunogenic epitopes of Epstein-Barr Virus (EBV) nuclear antigen 1 are encoded by sequence domains which vary among nasopharyngeal carcinoma biopsies and EBV-associated cell lines. *J. Gen. Virol.* **80**: 447-455.

Clark, D.J. and Felsenfeld, G. (1991). Formation of nucleosomes on positively supercoiled DNA. *EMBO J.* **10**: 387-395.

Cockerill, P.N. and Garrard, W.T. (1986). Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. *Cell* **44**: 273-282.

Cockerill, P.N., Yuen, M.H. and Garrard, W.T. (1987). The enhancer of the immunoglobulin heavy chain locus is flanked by presumptive chromosomal loop anchorage elements. *J. Biol. Chem.* **262**: 5394-5397.

Cockerill, P.N. (1990). Nuclear matrix attachment occurs in several regions of the IgH locus. *Nucleic Acids Res.* **18**: 2634-2648.

Cooper, M.J., Lipka, M., Payne, J.M., Hatzivassiliou, G., Reifenberg, E., Fayazi, B., Perales, J.C., Morrison, L.J., Templeton, D., Piekarz, R.L. und Tan, J. (1997). Safety-modified episomal vectors for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 6450-6455.

Coverley, D. and Laskey, R.A. (1994). Regulation of eukaryotic DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 745-76.

Craig, N. (1988). The mechanism of conservative site-specific recombination. *Annu. Rev. Genet.* **22**: 77-106.

Cremer, T. and Cremer, C. (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature Reviews Genetics.* **2**: 292-301.

Dang, Q., Auten, J. and Plavec, I. (2000). Human beta interferon scaffold attachment region inhibits de novo methylation and confers long-term, copy number-dependent expression to a retroviral vector. *J. Virol.* **74**: 2671-2678.

Davie, J.R. (1998). Covalent modifications of histones: expression from chromatin templates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**: 173-178.

de Belle, I., Cai, S. and Kohwi-Shigematsu, T. (1998). The genomic sequences bound to special AT-rich sequence-binding protein 1 (SATB1) in vivo in Jurkat T cells are tightly associated with the nuclear matrix at the bases of the chromatin loops. *The Journal of Cell Biology* **141**: 335-348.

DePamphilis, M.L. (1999). Replication origins in metazoan chromosomes: Fact or fiction? *BioEssays* **21**: 5-16.

Dickinson, L.A., Joh, T., Kohwi, Y. and Kohwi-Shigematsu, T. (1992). A tissue-specific MAR/SAR DNA-binding protein with unusual binding site recognition. *Cell* **70**: 631-645.

Dickinson, L.A., Dickinson, C.D., and Kohwi Shigematsu, T. (1997). An atypical homeodomain in SATB1 promotes specific recognition of the key structural element in a matrix attachment region. *J. Biol. Chem.* **272**: 11463-11470.

Dietz, A., Kay, V., Schlake, T., Landsmann, J. and Bode, J. (1994). A plant scaffold attached region detected close to a T-DNA integration site is active in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **22**: 2744-2751.

Dijkwel, P.A. and Hamlin, J.L. (1995). Origins of replication and the nuclear matrix: the DHFR domain as a paradigm. Structural and functional organization of the nuclear matrix. *Int. Rev. Cytol.* **162**: 455-484.

Ebersole, J.L. and Cappelli, D. (2000). Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. *Periodontol* **23**: 19-49.

Engelhardt, J.F., Yang, Y., Stratford-Perricaudet, L.D., Allen, E.D., Kozarsky, K., Perricaudet, M., Yankaskas, J.R. und Wilson, J.M. (1993). Direct gene transfer of human CFTR into human branchia epithelia of xenografts with E1-deleted adenoviruses. *Nat. Genet.* **4**: 1069-1078.

- Fackelmayer, F.O., Dahm, K., Renz, A., Ramsperger, U., and Richter, A.** (1994). Nucleic-acid-binding properties of hnRNP-U/SAF-A, a nuclear-matrix protein which binds DNA and RNA in vivo and in vitro. *Eur. J. Biochem.* **221**: 749-57.
- Fanning, E. und Knippers, R.** (1992). Structure and function of Simian Virus 40 Large Tumor Antigen. *Annu. Rev. Biochem.* **61**: 55-85.
- Farr, C.J., Stevanovic, M., Thomson, E.J., Goodfellow, P.N. and Cooke, H.J.** (1992). Telomere-associated chromosome fragmentation: applications in genome manipulation and analysis. *Nat. Genet.* **2**: 275-282.
- Felsenfeld, G. and McGhee, J.D.** (1986). Structure of the 30 nm chromatin fiber. *Cell* **44**: 375-377.
- Fiering, S., Kim, C., Epner E. and Groudine, M.** (1993). An "in-out" strategy using gene targeting and FLP recombinase for the functional dissection of complex DNA regulatory elements: Analysis of the β -globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 8469-8473.
- Finch, J. T. and Klug, A.** (1976). Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 1897-1901.
- Foster, K.A. and Collins, J.M.** (1985). The interrelation between DNA synthesis rates and DNA polymerases bound to the nuclear matrix in synchronised HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **260**: 4229-4235.
- Fukushige, S. and Sauer, B.** (1992). Genomic targeting with a positive-selection lox integration vector allows highly reproducible gene expression in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 7905-7909.
- Gahn, T.A. und Schildkraut, C.L.** (1989). The Epstein-Barr Virus Origin of Replication, oriP, contains both the initiation and termination sites of DNA-Replication. *Cell* **58**: 527-535.
- Gasser, S.M. and Laemmli, U.K.** (1986). Cohabitation of scaffold binding regions with upstream/enhancer elements of three developmentally regulated genes of *D. melanogaster*. *Cell* **46**: 521-530.

Grimes, B.R., Warburton, P.E. and Farr, C.J. (2002). Chromosome engineering: prospects for gene therapy. *Gene Ther.* **9**: 713-718.

Goetze, S. (2003). Funktionsanalysen nicht-kodierender genomischer DNA-Bereiche unter Berücksichtigung biomathematischer Modelle. Dissertation. Technische Universität Braunschweig.

Haase, S.B., Heinzel, S.S. and Calos, M.P. (1994). Transcription inhibits the replication of autonomously replicating plasmids in human cells. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 2516-2524.

Hall, Jr., G., Allen, G. C., Loer, D. S., Thompson, W. F., and Spiker, S. (1991). Nuclear scaffolds and scaffold-attachment regions in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 9320-9324.

Harrington, J.J., van Boekkelen, G., Mays, R.W., Gustashaw, K. und Willard, H.F. (1997). Formation of de novo centromeres and construction of first-generation human artificial minichromosomes. *Nat. Genet.* **15**: 345-355.

Hartley, J.L. and Donelson, J.E. (1980). Nucleotide sequence of the yeast plasmid. *Nature* **286**: 860-865.

Heller, R., Brown, E., Burgtorf, C. and Brown, W.R.A. (1996). Mini-chromosomes derived from human Y-chromosome by telomere directed chromosome breakage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 7125-7130.

Hendzel, M.J., Delcuve, G.P., and Davie, J.R. (1991). Histone deacetylase is component of the internal nuclear matrix. *J. Biol. Chem.* **266**: 21936-21942.

Hendzel, M.J., Sun, J.M., Chen, H.Y., Rattner, J.B., and Davie, J.R. (1994). Histone acetyltransferase is associated with the nuclear matrix. *J. Biol. Chem.* **269**: 22894-22901.

Hengge, U.R., Walker, P.S. und Vogel, J.C. (1996). Expression of naked DNA in human, pig and mouse skin. *J. Clin. Invest.* **97**: 2911-2916.

Hirt, B. (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cultures. *J. Mol. Biol.* **26**: 365-369.

Hoess, R.H., and Abremski, K. (1985). Mechanism of strand cleavage and exchange in the cre-lox site-specific recombination system. *J. Mol. Biol.* **181**: 351-362.

Holliday, R. (1968). Genetic recombination in funghi. Replication and recombination of genetic material, J.W. Peacock and R.D. Brooks, eds. Canberra, Australian Academy of Science. 157-174.

Horlick, R.A., Schilling, A.E., Samama, P., Swanson, R.N., Fitzpatrick, V.D., Robbins, A.K. and Damaj, B. (2000). Combinatorial gene expression using multiple episomal vectors. *Gene* **243**: 187-194.

Ish-Horowitz, D. and Burk, J.F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucl. Acids Res.* **9**: 2989-2998.

Jarman A.P. and Higgs D.R. (1988). Nuclear scaffold attachment sites in the human globin gene complexes. *EMBO J.* **7**: 3337-3344.

Jenke, B.H.C., Fetzer, C.P., Stehle, I.M., Jönsson, F., Fackelmayer, F.O., Conradt, H., Bode, J. and Lipps, H.J. (2002). An episomally replicating vector binds to the nuclear matrix protein SAF-A *in vivo*. *EMBO Rep.* **3**: 349-354.

Kadesch, T. and Berg, P. (1986). Effects of the position of the simian virus 40 enhancer on expression of multiple transcription units in a single plasmid. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 2593-2601.

Käs, E. and Laemmli, U.K. (1992). In vivo topoisomerase II cleavage of the *Drosophila* histone and satellite III repeats: DNA sequence and structural characteristics. *EMBO J.* **11**: 705-716.

Kay, V. and Bode, J. (1995). Detection of scaffold-attached regions (SARs) by in vitro techniques: activities of these elements in vivo. *Methods in molecular and cellular biology* **5**: 186-194.

Keller, C., Ladenburger, E.M., Kremer, M. and Knippers, R. (2002). The origin recognition complex marks a replication origin in the human TOP1 gene promoter. *J. Biol. Chem.* **277**: 31430-31440.

Kilby, N.J., Snaith, M. and Murray, J. (1993). Site specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet.* **9**: 413-421.

Klehr, D., Schlake, T., Maaß, K. and Bode, J. (1991). Scaffold-attached regions (SAR elements) mediate transcriptional effects due to butyrate. *Biochemistry* **31**: 3222-3229.

Kucherlapati, R.S., Eves, E.M., Song, K.Y., Morse, B.S., Smithies, O. (1984). Homologous recombination between plasmids in mammalian cells can be enhanced by treatment of input DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 3153-3157.

Kühn, R. and Schwenk, F. (1997). Advances in gene targeting methods. *Curr. Op. In Immunology* **9**: 183-188.

Lakso, M. Sauer, B., Mosinger, B. Jr., Lee, E.J., Manning, R.W., Yu, S.H., Mulder, K.L. and Westphal, H. (1992). Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 6232-6236.

Lehman, C.W. und Botchan, M.R. (1998). Segregation of viral plasmids depends on tethering to chromosomes and is regulated by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 4338-4343.

Levy-Wilson, B. and Fortier, C. (1989). The limits of the DNaseI-sensitive domain of the human apolipoprotein B gene coincide with the locations of chromosomal anchorage loops and define the 5' and 3' boundaries of the gene. *J. Biol. Chem.* **264**: 21196-21204.

Lewis, C.D., Lebkowski, J.S., Daly, A.K. and Laemmli, U.K. (1984). Interphase nuclear matrix and metaphase scaffolding structures. *J. Cell Sci.* **1**: 103-122.

Li, Z., Düllmann, J., Schiedlmeier, B., Schmidt, M., von Kalle, C., Meyer, J., Forster, M., Stocking, C., Wahlers, A., Frank, O., Ostertag, W., Köhlcke, K., Eckert, H.G., Fehse, B. and Baum, C. (2002). Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* **296**: 497.

Lipps, H.J. and Bode, J. (2001). Exploiting chromosomal and viral strategies: the design of safe and efficient non-viral gene transfer systems. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **3**: 133-141.

Liu, G., Malott, M. and Leffak, M. (2003). Multiple functional elements comprise a Mammalian chromosomal replicator. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 1832-1842.

Ludérus, M.E.E., de Graaf, A., Mattia, E., den Blaauwen, J.L., Grande, M.A., de Jong, L. and van Driel, R. (1992). Binding of matrix attachment regions to lamin B1. *Cell* **70**: 949-959.

Ludérus, M.E.E., Den Blaauwen, J.L., De Smit, O.J.B., Compton, D.A., and Van Driel, R. (1994). Binding of matrix attachment regions to lamin polymers involves single-stranded regions and the minor groove. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 6297-6305.

Marshall, E. (2001). Clinical research. Gene therapy: a suspect in leukemia-like disease. *Science* **298**: 34-35.

McKnight, G.L., Mudri, S.L., Mathewes, S.L., Traxinger, R.R., Marshall, S., Sheppard, P.O. and O'Hara, P.J. (1992). Molecular cloning, cDNA sequence, and bacterial expression of human glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase. *J. Biol. Chem.* **267**: 25208-25212.

McLean, G.R., Nakouzi, A., Casadevall, A. und Green, N.S. (2000). Human and murine immunoglobulin expression vector cassettes. *Mol. Immunology* **37**: 837-845.

McWhinney, C. and Leffak, M. (1990). Autonomous replication of a DNA fragment containing the chromosomal replication origin of the human c-myc gene. *Nucl. Acids Res.* **18**: 1233-1242.

Mechali, M. (2001). DNA replication origins: from sequence specificity to epigenetics. *Nat. Rev. Genet.* **2**: 640-645.

Mejia, J.E., Willmott, A., Levy, E., Earnshaw, W.C. and Larin, Z. (2001). Functional complementation of a genetic deficiency with human artificial chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.* **69**: 315-326.

Meselson, M.S. and Radding, C.M. (1975). A general model for genetic recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 358-361.

Mesner, L.D., Li, X., Dijkwel, P.A. and Hamlin, J.L. (2003). The dihydrofolate reductase origin of replication does not contain any nonredundant genetic elements required for origin activity. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 804-814.

Middleton, T. und Sugden, B. (1992). EBNA-1 can link the enhancer element to the initiator element of the Epstein-Barr Virus plasmid origin of DNA replication. *J. Virol.* **66**: 489-495.

Mielke, C., Kohwi, Y., Kohwi-Shigematsu, T. and Bode, J. (1990). Hierarchical binding of DNA fragments derived from scaffold-attached regions: Correlation of properties in vitro and function in vivo. *Biochemistry* **29**: 7475-7485.

Mielke, C., Tümmler, M., Schübeler, D., von Hoegen, I. and Hauser, H. (2000). Stabilized, long-term expression of heterodimeric proteins from tricistronic mRNA. *Gene* **254**: 1-8.

Mielke, C., Benham, C., Bode, J. and Breindl, M. (2002). Nuclear matrix association potential of regulatory elements in the collagen 1a1 gene. *J. Cell. Biochem.* **84**: 484-496.

Mirkovitch, J., Mirault, M.E. and Laemmli, U.K. (1984). Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. *Cell* **39**: 223-232.

Mirkovitch, J., Gasser, S.M. and Laemmli, U.K. (1988). Scaffold attachment of DNA loops in metaphase chromosomes. *J. Mol. Biol.* **200**: 101-110.

Murray, A.W. and Szostak, J.W. (1993). Construction of artificial chromosomes in yeast. *Nature.* **305**: 189-193.

Mutskov, V. and Felsenfeld, G. (2003). Silencing of a transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine 9. *EMBO J.* (im Druck).

Nagy, A. (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genomic tailoring. *Genesis* **26**: 99-109.

Namciu, S.J., Blochlinger, K.B., and Fournier, R.E. (1998). Human matrix attachment regions insulate transgene expression from chromosomal position effects in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 2382-2391.

Nan, X., Ng, H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N. and Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**: 386-389.

Nishikawa, M. and Huang, L. (2001). Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. *Hum. Gene Ther.* **12**: 861-870.

Ono, T., Fujino, Y., Tsuchiya, T. and Tsuda, M. (1990). Plasmid DNAs directly injected into mouse brain with lipofectin can be incorporated and expressed by brain cells. *Neurosci. Lett.* **117**: 259-263.

Parnell, T.J. and Geyer, P.K. (2000). Differences in insulator properties revealed by enhancer blocking assays on episomes. *EMBO J.* **19**: 5864-5874.

Paul, A.L. and Ferl, R.J. (1998). Higher order chromatin structures in maize and Arabidopsis. *Plant Cell* **10**: 1349-1359.

Paulson, J.R. and Laemmli, U.K. (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell* **12**: 817-828.

Phi-Van, L. and Strätling, W.H. (1988). The matrix attachment regions of the chicken lysozyme gene co-map with the boundaries of the chromatin domain. *EMBO J.* **7**: 655-664.

Piechaczek, C., Fetzer, C., Baiker, A., Bode, J. and Lipps, H.J. (1999). A vector based on the SV40 Origin of Replication and chromosomal S/MARs replicates episomally in CHO-K1 cells. *Nucl. Acids Res.* **27**: 426-428.

Pikaart, M.J., Recillas-Targa, F. and Felsenfeld, G. (1998). Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. *Genes and Dev.* **12**: 2852-2862.

Plautz, G.E., Yang, Z.Y., Wu, B.Y., Gao, X., Huang, L. and Nabel, G.J. (1993). Immunotherapy of malignancy by in vivo gene transfer into tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 4645-4649.

Price, G.B., Allarakhia, M., Cossons, N., Nielsen, T., Diaz-Perez, M., Friedlander, P., Tao, L. and Zannis-Hadjopoulos, M. (2003). Identification of a cis-element that determines autonomous DNA-replication in eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* **278**: 19649-19659.

Ramirez-Solis, R., Davis, A.C. and Bradley, A. (1993). Gene targeting in embryonic stem cells. *Methods Enzymol.* **225**: 855-878.

Raz, E., Carson, D.A., Parker, S.E., Parr, T.B., Abai, A.M., Aichinger, G., Gromkowski, S.H., Singh, M., Lew, D. and Yankauckas, M.A. (1994). Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 9519-9523.

Renz, A., and Fackelmayer, F.O. (1996). Purification and molecular cloning of the scaffold attachment factor B (SAF-B), a novel nuclear DNA binding protein from HeLa cells with high affinity for nuclear matrix/scaffold attachment DNA elements. *EMBO J.* **11**: 3431-40.

Richmond, T.J., Finch, J.T., Rushton, B., Rhodes, D. Klug, A. (1984). Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature* **311**: 532-537.

Roemig, H., Fackelmayer, F.O., Renz, A., Ramsperger, U., and Richter, A. (1992). Characterization of SAF-A, a novel nuclear DNA binding protein from HeLa cells with high affinity for nuclear matrix/scaffold attachment DNA elements. *EMBO J.* **11**: 3431-3440.

Rols, M.P. and Teissie, J. (1998). Electroporation of mammalian cells to macromolecules: control by pulse duration. *Biophys. J.* **75**: 1415-1423.

Romano, G., Michell, P., Pacilio, C. and Giordano, A. (2000). Latest developments in gene transfer technology: achievements, perspectives, and controversies over therapeutic applications. *Stem Cells.* **18**: 19-39.

Sadowski, P.D. (1993). Site-specific genetic recombination: hops, flips and flops. *FASEB J.* **7**: 760-767.

Saffery, R., Wong, L.H., Irvine, D.V., Bateman, M.A., Griffiths, B., Cutts, S.M., Cancilla, M.R., Cendron, A.C., Stafford, A.J. and Cho, K.H. (2001). Construction of neocentromere-based human minichromosomes by telomere-associated chromosomal truncation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**: 5705-5710.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour.

Sauer, B. and Henderson, N. (1990). Targeted insertion of exogenous DNA into the eukaryotic genome by the cre recombinase. *The New Biologist* **2**: 441-449.

Sauer, B. (1994). Site-specific recombination: Developments and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **5**: 521-527.

Schaarschmidt, D., Baltin, J., Stehle, I.M., Lipps, H.J. and Knippers, R. (2003). An episomal mammalian replicon: sequence-independent binding of the origin recognition complex. *EMBO J.* (im Druck).

Schirmbeck, R. and Deppert, W. (1987). Specific interaction of Simian Virus 40 large T-antigen with cellular chromatin and nuclear matrix during the course of infection. *J. Virol.* **61**: 3561-3569.

Schirmbeck, R. and Deppert, W. (1991). Structural topography of Simian Virus 40 DNA replication. *J. Virol.* **65**: 2578-2588.

Schlake, T. and Bode, J. (1994). Use of mutated FLP recognition target (FRT) sites for the exchange of expression cassettes at defined chromosomal loci. *Biochemistry* **33**: 12746-12751.

Schmidt, E.E., Taylor, D.S., Prigge, J.R., Barnett, S. and Capecchi, M.R. (2000). Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 13702-13707.

Schübeler, D., Maaß, K. and Bode, J. (1998). Retargeting of retroviral integration sites for the predictable expression of transgenes and the analysis of cis-acting sequences. *Biochemistry*. **37**: 11907-11914.

Seibler, J., Schübeler, D., Fiering, S., Groudine, M. and Bode, J. (1998). DNA cassette exchange in ES cells mediated by FLP recombinase: An efficient strategy for repeated modification of tagged loci by marker-free constructs. *Biochemistry* **37**: 6229-6234.

Seibler, J. (1999). Sequenzspezifische Rekombination zur gezielten Manipulation des Mammaliagenoms. Dissertation. Technische Universität Braunschweig.

Senecoff, J.F. and Cox, M.M. (1986). Directionality in FLP protein-promoted site-specific recombination is mediated by DNA-DNA pairing. *J. Biol. Chem.* **261**: 7380-7386.

Shirakata, M and Hirai, K. (1998). Identification of minimal oriP of Epstein-Barr Virus required for DNA replication. *J. Biochem.* **123**: 175-181.

Simpson, R.T. (1986). Nucleosome positioning *in vivo* and *in vitro*. *BioEssays* **4**: 172-176.

Singh, G.B., Kramer, J.A., and Krawetz, S.A. (1997). Mathematical model to predict regions of chromatin attachment to the nuclear matrix. *Nucleic Acids Res.* **25**: 1419-1425.

Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.

Spencer, C. and Groudine, M. (1990). Transcription elongation and eukaryotic gene regulation. *Oncogene* **5**: 777-785.

Stehle, I.M., Scinteie, M.F., Baiker, A., Jenke, A.C.W. and Lipps, H.J. (2003). Exploiting a minimal system to study the epigenetic control of DNA replication: the interplay between transcription and replication. *Chrom. Res.* **11**: 413-421.

Suzuki, Y., Oshugi, K. and Ono, Y. (1992). EBV increases phosphoinositide kinase activities in human B cells. *J. Immunology* **149**: 207-213.

Taniguchi, M., Sanbo, M., Watanabe, S., Naruse, I., Mishina, M. and Yagi, T. (1998). Efficient production of Cre-mediated site-directed recombinants through the utilization of the puromycin resistance gene, *pac*: a transient gene-integration marker for ES cells. *Nucl. Acids Res.* **26**: 679-680.

Thyagarajan, B., Guimarães, M.J., Groth, A.C. and Calos, M.P. (2000). Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene* **244**: 47-54.

Titomirov, A.V., Sukharev, S. and Kistanova, E. (1991). In vivo electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA. *Biochem. Biophys. Acta.* **1088**: 131-134.

Travers, A.A. (1987). DNA bending and nucleosome positioning. *Trends Biochem. Sci.* **12**: 108-112.

Unsinger, J. (2001). Entwicklung regulierbarer retro- und adenoviraler Vektoren für die Gentherapie. Dissertation. Technische Universität Braunschweig.

Verhoeven, E., Hauser, H. and Wirth, D. (1998). Efficient targeting of retrovirally FRT-tagged chromosomal loci. Technical Tips Online T01515 (<http://tto.trends.com>).

Vernhes, M.C., Cabanes, P.A. and Teissie, J. (1999). Chinese hamster ovary cells sensitivity to localized electrical stress. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **48**: 17-25.

Volkert, F.C., Wilson, D.W. and Broach, J.R. (1989). Deoxyribonucleic acid plasmids in yeast. *Microbiological Reviews* **53**: 299-317.

von Kries, J. P., Buhrmester, H. and Strätling, W.H. (1991). A matrix/scaffold attachment region binding protein: Identification, purification, and mode of binding. *Cell* **64**: 123-135.

Wade, P.A., Pruss, D. and Wolffe, A.P. (1997). Histone acetylation: chromatin in action. *TIBS* **22**: 128-132.

Wade-Martins, R., Frampton, J. and James, M.R. (1999). Long-term stability of large insert genomic DNA episomal shuttle vectors in human cells. *Nucl. Acids Res.* **27**: 1674-1682.

Weitzel, J.M., Buhrmeister, H. and Stratling, W.H. (1997). Chicken MAR-binding protein ARBP is homologous to rat methyl-CpG binding protein MeCP2. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 5656-5666.

Wessel, R., Schweizer, J. and Stahl, H. (1992). Simian Virus 40 T-Antigen DNA Helicase is a hexamer which forms a binary complex during bidirectional unwinding from the viral origin of DNA replication. *J. Virol.* **66**: 804-815.

Westphal, E.M., Sierakowska, H., Livanos, E., Kole, R. and Vos, J.M. (1998). A system for shuttling 200-kb BAC/PAC clones into human cells: stable extrachromosomal persistence and long-term ectopic gene activation. *Hum. Gene Ther.* **9**: 1863-1873.

Willard, H.F. (1998). Human artificial chromosomes coming into focus. *Nature Biotechnology* **16**: 415-416.

Wilson, C., Bellen, H.J., Gehring, W.J. (1990). Position effects on eukaryotic gene expression. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **6**: 679-714.

Wodarczyk, C. (2003). Etablierung von ES-Zelllinien zur vorhersagbaren autoregulierten Expression von Transgenen in Mäusen. Dissertation. Technische Universität Braunschweig.

Wollfe, A. and Pruss, D. (1996). Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. *Cell* **84**: 817-81.

Wong, T.K. and Neumann, E. (1982). Electric field mediated gene transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **107**: 584-587.

Wong, L.H., Saffery, R. and Cho, K.H. (2002). Construction of neocentromere-based human minichromosomes for gene delivery and centromere studies. *Gene Ther.* **9**: 724-726.

Yang, Y., Nunes, F.A., Berencsi, K., Furth, E.E., Gönczöl, E. and Wilson, J.M. (1994). Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 4407-4411.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe Epigenetische Regulation an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF), Braunschweig durchgeführt. Mein besonderer Dank gilt daher Herrn Prof. Dr. Jürgen Bode für die Ermöglichung und Betreuung der Dissertation, sowie für seine stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Ralf-Rainer Mendel danke ich für das Koreferat und dafür, dass er zusammen mit Herrn Prof. Dr. Jürgen Bode die Arbeit vor der Naturwissenschaftlichen Fakultät der technischen Universität Braunschweig vertritt. Auch Herrn Prof. Dr. Dieter Jahn danke ich für seine Bereitschaft zur Teilnahme an der Prüfungskommission.

Mein Dank geht weiterhin an alle Kollegen und Freunde der gesamten Arbeitsgruppe. Durch das sehr angenehme und stets recht lockere Arbeitsklima, sowie durch die stete Hilfsbereitschaft jedes Einzelnen wird mir die Zeit meiner Doktorarbeit für immer in schöner Erinnerung bleiben.

Mein ganz besonderer Dank gilt natürlich den ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des SAR-Labors. Ich danke ganz besonders Alexandra Baer für die freundschaftliche Betreuung auch über meine Diplomarbeit hinaus. Ich danke Karin Maaß, Sandra Goetze, Angela Gluch, Martin Klar, André Oumard, Silke Winkelmann und Melita Vidakovic, für eine tolle Zeit, für die vielen wertvollen sachlichen und unsachlichen Diskussionen, für die guten Ratschläge, wenn mal wieder mein Glaube an die Episomen geschwächt war und für die gemeinsamen Feierabendbiere, die wir uns oft genug verdient hatten... t.b.c.

Ich danke Sandra Goetze und Claas Wodarczyk für die Durchsicht des Manuskripts und die konstruktive Kritik, die mir sehr weitergeholfen hat.

Ein herzlicher Dank gilt meinen Eltern, die immer für mich da sind und mich auf freundschaftliche Art stets selbstlos unterstützen.

Mein allerherzlichster Dank gilt natürlich meinem lieben Freund Pascal, der mit mir alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit und auch des „richtigen Lebens“ durchgestanden hat. Durch seine Erfahrungen hat er mir den nötigen Rückhalt geboten und wenn mal wieder alles schief lief, richtete er mich wieder auf und gab mir die Kraft durchzuhalten. Danke für alles.